



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Descoberta e desenvolvimento de esteróides da série pregnano com acção anticancerígena**

**Márcio Filipe Monteiro Geraldês**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Samuel Martins Silvestre

Co-orientador: Professora Doutora Luiza Augusta Tereza Gil  
Breitenfeld Granadeiro

**Covilhã, Outubro de 2011**



“A melhor maneira de prever o futuro é criá-lo”

Peter Drucker



# Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer, ao meu orientador, Doutor Samuel Silvestre, que aceitou orientar esta tese, entendendo as minhas dúvidas e forma de trabalhar, o meu muito obrigado pela sua disponibilidade, apoio, amizade e ensinamentos prestados.

À professora Doutora Luíza Granadeiro, pela sua disponibilidade e dedicação.

O meu agradecimento especial à minha colega e amiga Ana Rebelo pela amizade, palavras amigas, bem como toda a disponibilidade e entusiasmo enérgico e contagiante que sempre demonstrou na realização deste trabalho.

À minha grande amiga Lúcia Gonçalves pela amizade de longos anos, pela sua dedicação, disponibilidade, ajuda, o meu sincero agradecimento.

Aos meus colegas e amigos pelo apoio demonstrado ao longo destes anos.

A todos os meus colegas e amigos de curso, pela compreensão, disponibilidade, ajuda e amizade.

À Universidade da Beira Interior, na pessoa do seu reitor, Professor Doutor João António Sampaio Rodrigues Queiroz, que me possibilitou as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer de uma forma muito especial e sentida à minha Família. Aos meus Pais e irmão, pelo amor, confiança, estímulo e apoio incondicionais que sempre me deram, pelos valores morais que me inculcaram. A vossa presença constante permitiu-me sentir sempre confiante e capaz de realizar todos os objectivos a que me proponho.

Por último, sem menosprezar ninguém, gostaria de dedicar esta tese à minha namorada, Catarina Canário, pelo amor, amizade, dedicação e compreensão nos momentos de ausência a que me dedicava à realização deste projecto e momentos de estudo.



# Resumo

O cancro é uma patologia com elevada morbilidade e mortalidade e enorme impacto socio-económico nos dias de hoje. No entanto, apesar dos enormes avanços científicos, a sua incidência tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Actualmente são conhecidos e utilizados vários agentes químicos no tratamento dos tumores malignos. Contudo, a sua baixa eficácia, os efeitos secundários severos associados e o aparecimento de resistências têm impulsionado a investigação na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos nesta área ao longo das últimas décadas. Assim o contexto geral deste trabalho é a descoberta e desenvolvimento de compostos químicos com potencial acção anticancerígena.

Considerando as propriedades farmacocinéticas e a actividade biológica conhecida dos esteróides e o potencial anticancerígeno já descrito para alguns esteróides da série pregnano funcionalizados no anel D, pretendeu-se com este trabalho, preparar e avaliar esteróides da série pregnano funcionalizados no anel D com potencial acção anti-tumoral. Assim, no presente trabalho foram sintetizados, purificados e parcialmente caracterizados, por IV e RMN, vários esteróides pregnanos funcionalizados no anel D, principalmente hidroxilados, com e sem grupo 3 $\beta$ -acetato e 20-oximas. As vias sintéticas seguidas permitiram a obtenção de rendimentos moderados a elevados dos pregnanos referidos.

A acção antiproliferativa dos esteróides pregnanos preparados foi avaliada em células cancerígenas (MCF-7 e LNCaP) e normais (NHDF) e, quando possível, foi determinado o IC<sub>50</sub>.

O presente estudo permitiu-nos concluir, através do estudo da relação estrutura-actividade citotóxica, que os compostos pregnanos avaliados têm diferentes capacidades anti-proliferativas nas células cancerígenas, verificando-se que os compostos mais tóxicos para estas células foram os derivados 3 $\beta$ -hidroxilados, esteróides saturados no anel D bem como 20-oximas. Adicionalmente, a maioria dos compostos revelou ser selectivo na sua acção antiproliferativa para as células cancerígenas em comparação com as não-cancerígenas. Estes dados pretendem acrescentar informação estrutural relevante para continuar a desenvolver compostos com potencial interesse como agentes anticancerígenos.

## Palavras-chave:

síntese química, linhas celulares, pregnanos antitumorais, relações estrutura-actividade





# Abstract

Cancer is a disease with high morbidity and mortality and today with a huge socio-economic impact. However, despite enormous scientific advances, its incidence has been increasing over the years. Currently it is known and used various chemical agents in the treatment of malignant tumors. However, their low efficacy, severe side effects associated and the emergence of resistance have stimulated research in the discovery and development of new drugs and medicines in this area over the past decades. So the context of this work is the discovery and development of chemical compounds with potential anticancer action.

Considering the pharmacokinetic properties and biological activity of steroids and their potential action antitumor, already described for some pregnanes functionalized in D ring, it was intended with this work, to prepare and evaluate pregnane steroids functionalized in ring D with potential antitumor action.

In the present work we synthesized, purified and partially characterized, by IV and NMR, various pregnanes functionalized in D ring, especially hydroxylated with or without 3 $\beta$ -acetate group and 20-oximes. The synthetic pathways followed allowed us to obtain moderate to high yields of pregnanes.

The antiproliferative action of the prepared pregnanes was evaluated in cancer cells (MCF-7 and LNCaP) and normal cells (NHDF) and, when possible, the IC<sub>50</sub> was determined.

This study allowed us to conclude, through the study of structure-activity relationship, that cytotoxic pregnane compounds studied have different anti-proliferative capacity in cancer cells, verifying that the most toxic compounds to these cells were 3 $\beta$ -hydroxylated derivatives, with a saturated D-ring, as well as 20-oxime compounds. In addition, it was verified for the majority of the compounds, a selective antiproliferative activity towards cancerous *versus* non-cancerous cells. This information can be of interest in the improvement of the anticancer properties of pregnane derivatives.

## Keywords

chemical synthesis, cell lines, antitumor pregnanes, structure-activity relationships



# Índice geral

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice geral	xi
Lista de gráficos	xiii
Lista de figuras	xv
Lista de tabelas	xvii
Lista de acrónimos	xix
1. Justificação do tema	1
2. Introdução	3
2.1 Cancros hormono-dependentes	3
2.1.1 Cancro da mama (CM)	4
2.1.2 Cancro da próstata (CP)	6
2.2 Esteroidogénese no organismo humano	7
2.3 Importância biológica e sintética de esteróides	10
2.4 Obtenção de esteróides	12
2.5 Tratamento de tumores hormono-dependentes	16
2.6 Exemplo de esteróides da classe pregnano bioactivos	18
3. Objectivos	23
3.1 Objectivos geral	23
3.2 Objectivos específicos	23
4. Parte experimental	25
4.1 Síntese química	25
4.1.1 Materiais	25
4.1.2 Separação	25
4.1.3 Instrumentos e equipamento	26
4.1.4 Procedimento experimental	26
4.1.4.1 Síntese da 16-desidropregnenolona 1	26
4.1.4.2 Síntese do 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona 3	27
4.1.4.3 Síntese do 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxipregn-5-en-20-ona 4	27
4.1.4.4 Síntese do acetato de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -ilo 5	28
4.1.4.5 Síntese do acetato de 16 $\alpha$ -hidroxi-20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -ilo 6	29
4.1.4.6 Síntese do acetato do 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-20-	29

oxopregn-5-en-3 $\beta$ -ilo 7	
4.1.4.7 Síntese da oxima da 16-desidropregnenolona acetato 8	30
4.1.4.8 Síntese da pregnenolona 10	30
4.1.4.9 Síntese da oxima da pregnenolona acetato 11	31
4.1.4.10 Síntese da oxima da pregnenolona 12	31
4.1.4.11 Síntese do diacetato de 20-oxo-pregn-5-en-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -di-ilo 13	32
4.2 Avaliação biológica	33
4.2.1 Material	33
4.2.1.1 Reagentes	33
4.2.1.2 Instrumentação	33
4.2.2 Tipo de células usadas neste estudo e sua cultura	34
4.2.3 Técnicas de cultura celular utilizadas	35
4.2.3.1 Tripsinização	35
4.2.3.2 Contagem de células	35
4.2.3.3 Procedimento geral realizado para avaliar o efeito dos compostos estudados na viabilidade celular	36
4.2.3.4 Ensaio para analisar a viabilidade celular - MTT	36
4.2.4 Análise estatística	37
5. Resultados e discussão	39
5.1 Estratégia de síntese	39
5.1.1 Hidrólise alcalina	41
5.1.2 Epoxidação $\alpha$ -selectiva de $\Delta^{16}$ -esteróides pelo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	41
5.1.3 Abertura redutiva de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-cetonas usando hidrato de hidrazina	42
5.1.4 Acetilação	44
5.1.5 Dihidroxilação $\alpha$ -selectiva de $\Delta^{16}$ -esteróides usando KMnO <sub>4</sub>	46
5.1.6 Síntese de 20-C oximas	47
5.2 Aplicação da estratégia de síntese	49
5.3 Avaliação biológica	52
5.3.1 Células NHDF e MCF-7	52
5.3.2 Comparações das citotoxicidade dos compostos pregnano avaliados nas células MCF-7	60
5.3.3 Comparações das citotoxicidade dos compostos pregnano avaliados nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP	65
5.4 Discussão	69
6. Conclusão	73
7. Bibliografia	75

## Lista de gráficos

Gráfico 1. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 1 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 2. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 2 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 3. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 3 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 4. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 4 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 5. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 5 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 6. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 6 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 7. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 7 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 8. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 8 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 9. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 9 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 10. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 10 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 11. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 11 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 12. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 12 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 13. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 13 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 14. Viabilidade celular relativa das células MCF-7, quando incubadas com os pregnanos 1 e 2 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da

quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 15. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 9 e 10 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 16. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 3 e 5 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 17. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 2 e 10 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 18. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 1 e 10 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 19. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 5 e 9 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 20. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 1 e 8 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 21. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 4 e 10 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 22. Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 2 e 4 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 23. Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, quando incubadas com o esteróide 2 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 24. Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, incubadas com o composto 4 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 25. Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, incubadas com o pregnano 10 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

Gráfico 26. Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, incubadas com o pregnano 3 em concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm.

# Lista de Figuras

- Figura 1. Mecanismo de acção dos inibidores da aromatase e tamoxifeno.
- Figura 2. Representação do córtex supra-renal.
- Figura 3. Esquema ilustrativo da esteroideogénese adrenal.
- Figura 4. Sistema de numeração de esteróides.
- Figura 5. Síntese simplificada da 16-DHP Ac.(D) a partir da diosgenina (A).
- Figura 6. Síntese simplificada da 16-DHP Ac.a partir da diosgenina elaborada por *Mićović et al.*, (1990).
- Figura 7. Síntese simplificada da 16-DHP Ac. a partir da diosgenina relatada por Goswami (2003).
- Figura 8. Estrutura química da Diosgenina e Solasodina.
- Figura 9. Exemplo de esteróides obtidos a partir de sementes de soja.
- Figura 10 - Activação do receptor esteróide.
- Figura 11. Compostos pregnano esteróides bioactivos.
- Figura 12. Exemplos de compostos sintetizados e avaliados nas células LNCaP e PC-3 por Ma e Kim (2009).
- Figura 13. Mecanismo da reacção de hidrólise dos derivados pregnano 1 e 9.
- Figura 14. Mecanismo da reacção de epoxidação do derivado pregnano 1.
- Figura 15. Redução selectiva de  $\alpha,\beta$  cetonas a  $\beta$ -cetonas usando sais de crómio.
- Figura 16. Redução selectiva de  $\alpha,\beta$  cetonas a  $\beta$ -cetonas usando hidrato de hidrazina em etanol.
- Figura 17. Mecanismo da reacção de redução selectiva de  $\alpha,\beta$ -epoxi cetonas.
- Figura 18. Mecanismo da reacção de acetilação usando o catalisador 4-dimetilamino-piridina (DMAP).
- Figura 19. Mecanismo reaccional da dihidroxilação  $\alpha$ -selectiva de  $\Delta^{16}$ -esteróides usando  $\text{KMnO}_4$ .
- Figura 20. Representação do mecanismo reaccional da formação de oximas.
- Figura 21. Reacção de hidrólise do composto 1. (a) KOH, MeOH, 30°C, 2h.
- Figura 22. Clivagem redutiva do epóxido 5, usando hidrato de hidrazina.
- Esquema 1. Representação da estratégia de síntese de compostos pregnano esteróides delineada para o presente trabalho.





# Lista de Tabelas

Tabela 1. Nomenclatura das enzimas esteroideogénicas.

Tabela 2. Valores de  $IC_{50}$  dos compostos pregnano esteróides sobre as linhas de células MCF-7, LNCaP e NHDF.



# Lista de Acrónimos

Ac	Acetilo
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
AD	Androstenodiona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Receptor de androgénios
5 $\alpha$ R	Enzima 5 $\alpha$ -redutase
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CM	Cancro da mama
CP	Cancro da próstata
CYP450	Citocromo P450
$\delta$	Desvio químico (ppm)
DHEA	Desidroepiandrosterona
16-DHP Ac.	Acetato de 16-desidropregnenolona
DHT	Di-hidrotestosterona
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
d	Dubleto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER	Receptor de estrogénios
ex.	Exemplo
FBS	Soro fetal bovino
GR	Receptor de glucocorticóides
HBP	Hiperplasia benigna da próstata
HSD	Hidroxiesteróide desidrogenase
IV	Infra-vermelho
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
m	Multipleto
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
Me	Metilo
MDR	Multidrug resistance
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NHDF	<i>Normal human dermal fibroblasts</i>
OAc	Acetato
PBS	Tampão fosfato salino

PR	Receptor de progesterona
R <sub>f</sub>	Factor de retenção
<sup>13</sup> C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<sup>1</sup> H RMN	Ressonância magnética nuclear de prótons
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Singuleto
t	Tripleto
T	Testosterona
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina
UV	Ultra-violeta

# 1. Justificação do Tema

O cancro é uma patologia com elevada morbilidade e mortalidade, e em que, apesar dos enormes avanços científicos, a incidência tem vindo a aumentar. Actualmente são conhecidos e utilizados vários agentes químicos no tratamento de tumores, mas dada a sua baixa eficácia, os efeitos adversos e as resistências que ocorrem, têm-se procurado desenvolver novos fármacos que colmatem as desvantagens dos fármacos existentes. É vastamente conhecida a importância do uso de esteróides no tratamento de tumores hormono-dependentes. Devido à sua estrutura rígida e à possibilidade de diversas funcionalizações, bem como ao seu perfil de actividade biológica alargado, à sua capacidade para atravessar as membranas celulares e ligar-se aos receptores específicos, os esteróides têm sido estruturas base para o desenvolvimento de novas moléculas bioactivas. Sabe-se da literatura que a funcionalização de esteróides da série pregnano, nomeadamente no anel D, pode originar moléculas com melhor potencial terapêutico, incluindo acção anti-tumoral.

Assim, o presente trabalho compreende a síntese de compostos esteróides da série pregnano funcionalizando o anel D, através de reacções de di-hidroxilação, epoxidação, síntese de oximas, abertura reductiva de epóxidos e acetilação e a avaliação da sua actividade citotóxica/antiproliferativa em células de cancro da mama (MCF-7) e de cancro da próstata hormono-dependentes (LNCaP) e em fibroblastos da derme humana, não-cancerígenos.



## 2. Introdução

### 2.1 Cancros hormono-dependentes

O cancro é uma patologia com elevada morbilidade e mortalidade e, nos dias de hoje, com um enorme impacto socio-económico.<sup>1</sup> Esta patologia consiste, normalmente, numa proliferação, anormal de células. As células crescem e dividem-se de modo controlado de forma a formar novas células. No seu ciclo de vida, as células envelhecem, morrem e são substituídas por novas células. Algumas vezes, este processo, controlado, falha, e formam-se novas células, sem que o organismo necessite e, ao mesmo tempo, as células velhas tendem em não morrer. Este conjunto de células extra forma um tumor.<sup>2</sup>

O cancro é entendido como a grave situação patológica clínica que é gerada por uma neoplasia, a qual é classificada como maligna devido à situação clínica potencialmente fatal que origina.

O tumor maligno ou cancro distingue-se do tumor benigno principalmente devido ao facto de colocar vida do doente em risco, ao contrário do tumor benigno que, geralmente não. A grande maioria dos tumores malignos é invasiva, e é a sua infiltração progressiva de estruturas adjacentes, ou distantes, através de metástases, que cria disfunções nos órgãos invadidos e reacções imunitárias às lesões que levam à insuficiência ou má função de órgãos vitais.<sup>3</sup>

No mundo inteiro, milhões de pessoas vivem com o diagnóstico de cancro. Então, inquestionavelmente, é necessária uma investigação constante nesta área.<sup>2</sup> Cada vez mais se conhecem as suas causas e a forma como se desenvolve.<sup>2</sup> No entanto, apesar dos enormes avanços científicos, a sua incidência tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Actualmente são conhecidos e utilizados vários agentes químicos no tratamento dos tumores malignos, mas a baixa eficácia, os efeitos secundários severos associados e o aparecimento de resistências têm impulsionado a investigação na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos ao longo das últimas décadas.<sup>1</sup>

Esta patologia é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos, e é considerada a segunda principal causa de mortalidade nos países em vias de desenvolvimento.<sup>3</sup> Com base em dados estatísticos evidenciados na *CA CANCER J CLIN 2011*, em todo o mundo, ocorreram aproximadamente 12,7 milhões de casos de cancro, e destes 7,6 milhões faleceram devido a esta doença multifactorial. Não considerando o cancro da pele, a nível mundial, os tipos de cancro mais prevalentes são o cancro do pulmão e brônquios no homem e o cancro da mama (CM) na mulher. Contudo, o cancro da próstata (CP) é o mais prevalente nos homens dos países economicamente desenvolvidos.<sup>4</sup>

Os cancros hormono-dependentes estão entre as principais doenças do mundo moderno.<sup>5</sup>

Estes induzem nomeadamente, alguns cancros da mama, da próstata e do endométrio.<sup>3</sup> Neste contexto, o cancro da mama é a principal causa de morte relacionada com cancro em mulheres em todo o mundo<sup>6</sup>, surgindo cerca de um milhão de novos casos por ano<sup>7,8</sup>, o que tem justificado a permanente necessidade de desenvolver fármacos úteis contra esta patologia. Assim, neste âmbito, tem-se tentado desenvolver novos fármacos nomeadamente mediante a funcionalização de estrogénios esteróides.<sup>9</sup>

O desenvolvimento de tumores hormono-dependentes envolve a estimulação da proliferação celular por hormonas. Os tumores sensíveis a hormonas (por exemplo, mama e próstata) são definidos como aqueles em que a expressão dos receptores de estrogénios ou androgénios se encontra acima de um limite detectável pré-estabelecido.<sup>10</sup>

30 a 50% dos cancros da mama são estrogénio-dependentes e, a maioria destes verifica-se em mulheres pós-menopáusicas, em que a função dos ovários e o controlo hipofisário de produção de estrogénios cessaram<sup>11</sup>. Assim, a diminuição dos níveis de estrogénio, nomeadamente por inibição da sua síntese é uma das primeiras hipóteses da terapêutica em doentes com cancro da mama estrogénio-dependente.<sup>12</sup>

Em diversos tipos de cancro hormono-dependentes, da próstata e outros, as hormonas de suporte são de importância fundamental na manutenção da vida da célula maligna pois na sua ausência as células cancerígenas morrem.<sup>13</sup>

Neste contexto, é importante denotar que alguns dos fármacos que têm sido utilizados no tratamento de vários tipos de cancro, apresentam como estrutura base o esteróide.<sup>14</sup>

### 2.1.1 Cancro da mama (CM)

A mama é um órgão complexo constituído por pele, tecido subcutâneo, tecido adiposo e estruturas de ramificação ductal e glandular. Várias patologias que afectam essas estruturas podem originar nódulos palpáveis. Além disso, as variações associadas com o ciclo menstrual também podem causar anormalidades na mama.<sup>15</sup>

O CM é a uma das formas mais comuns de cancro no mundo moderno. Os dois factores mais fortemente associados com a ocorrência de cancro da mama são a idade e o género. O risco de vir a desenvolver cancro aumenta com a idade, sendo que uma em cada 8 mulheres pode vir a desenvolver cancro da mama ao longo da sua vida.<sup>15</sup> Embora mais raro, o CM também pode aparecer em homens e, como nestes casos o diagnóstico geralmente ocorre em fases mais avançadas da doença, o que se julga explicar o facto que as taxas de mortalidade sejam mais elevadas no género masculino. Para além da idade e género, existem outros factores de risco adicionais que incluem: factores endócrinos, factores genéticos, factores ambientais e estilos de vida.<sup>15</sup> As taxas de incidência de CM variam consideravelmente entre países, o que sugere que tanto os factores ambientais como o estilo de vida das populações podem desempenhar um papel importante na etiologia da doença.<sup>2</sup>

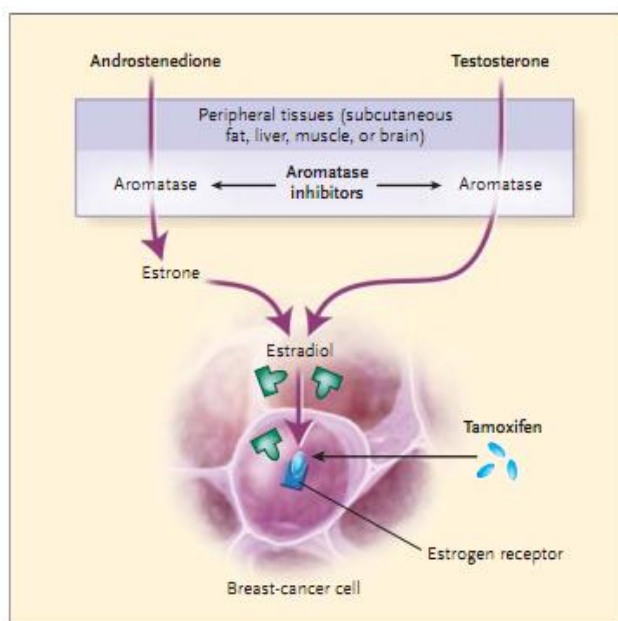


O CM que se limita a uma lesão localizada na mama é, muitas vezes referido como *precoce, primária, localizada, ou curável*. Também o CM que já se encontra disseminado nos gânglios linfáticos locais é considerado na fase precoce. Infelizmente, as células do CM, muitas vezes vão pelos canais linfáticos e através do sangue migram para locais distantes no organismo humano. Sempre que as células malignas da mama forem detectadas clínica ou radiologicamente, em locais distantes da mama, a doença é referida como *avançada ou cancro da mama metastizado*. Os tecidos mais comumente envolvidos nas metástases são os nódulos linfáticos (outros para além dos linfáticos locais e regionais), pele, ossos, fígado, pulmões e cérebro.<sup>15</sup>

O estrogénio é a principal hormona envolvida no desenvolvimento e crescimento de tumores da mama. Então, a privação de estrogénio continua a ser uma abordagem terapêutica importante.<sup>16</sup>

O tamoxifeno inibe o crescimento de tumores de mama pelo através de um mecanismo antagonismo competitivo do receptor dos estrogénios (Figura 1). As suas acções são complexas, no entanto, também apresenta efeitos parciais de agonistas de estrogénios. Estes efeitos agonistas podem ser benéficos, uma vez que podem ajudar a prevenir a desmineralização óssea em mulheres pós-menopáusicas, mas também prejudicial, uma vez que estão associados com risco aumentado de cancro do útero.<sup>16</sup>

Em contraste, os inibidores da aromatase marcadamente suprimem os níveis plasmáticos de estrogénios mulheres pós-menopáusicas devido à inibição da aromatase (enzima responsável pela síntese de estrogénios a partir de substratos androgénicos (Figura 1). Ao contrário dos tamoxifeno, os inibidores da aromatase não apresentam actividade agonista parcial.<sup>16</sup>



**Figura 1.** Mecanismo de acção dos inibidores da aromatase e tamoxifeno. (Imagens retiradas da referência 16)

### 2.1.2 Cancro da próstata (CP)

A próstata normal é composta por células secretoras acinares, dispostas radialmente e rodeadas por tecido de suporte. O tamanho, forma ou presença de ácinos estão normalmente alterados na próstata invadida por um carcinoma prostático.<sup>15</sup>

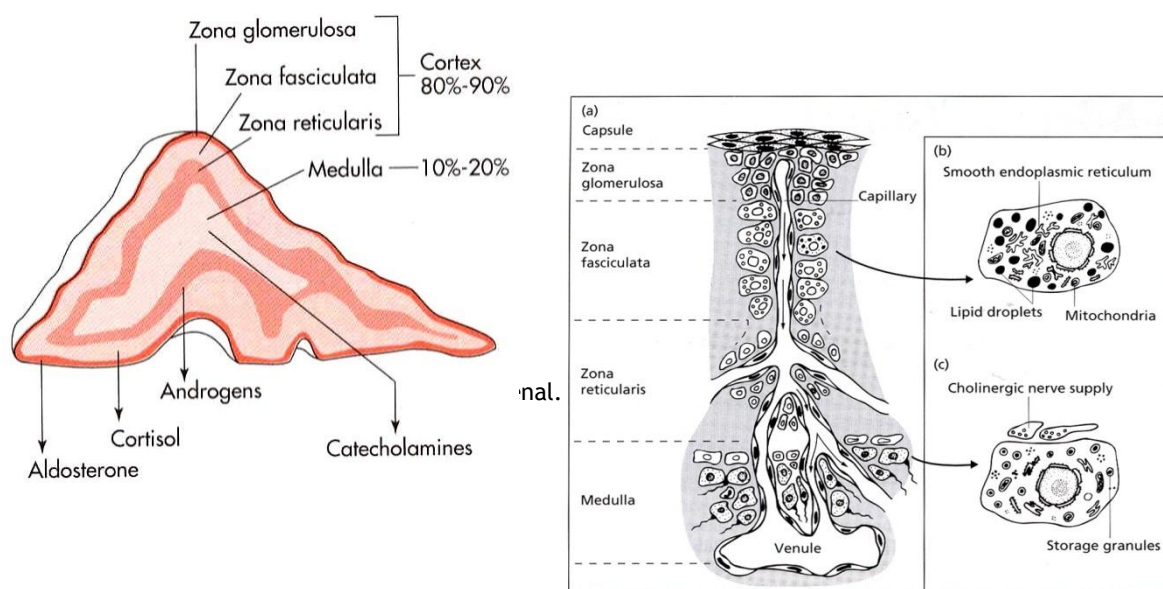
O CP é o segundo tipo de cancro mais comum em todo o mundo, numa determinada fase, trata-se de uma doença androgénio-dependente<sup>17</sup>, sendo a manipulação hormonal a base para o tratamento desta doença na sua fase avançada.<sup>15</sup> A enzima 17 $\alpha$ -hidroxilase-17,20-liase desempenha um papel importante nas vias biossintéticas das hormonas esteróides.<sup>17</sup> Esta enzima está envolvida na conversão da pregnenolona a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona e da progesterona a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (actividade 17 $\alpha$ -OH), e seguida a actividade liase é responsável pela clivagem da cadeia lateral destes derivados hidroxilados para formar desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (AD), respectivamente. A DHEA e AD são precursores dos androgénios, testosterona (T) e dihidrotestosterona (DHT).<sup>18</sup>

Assim, a completa da enzima 17 $\alpha$ -hidroxilase-17,20-liase permite bloquear a síntese de androgénios, sendo esta uma estratégia útil na terapêutica desta patologia.<sup>17</sup>

A T e DHT desempenham um papel fundamental na manutenção da proliferação celular na próstata. A enzima esteróide 5 $\alpha$ -redutase (5 $\alpha$ R) catalisa a redutiva conversão de T a DHT, NADPH-dependente. Uma anormalidade na actividade da 5 $\alpha$ R em humanos pode resultar num acréscimo dos níveis de DHT nos tecidos periféricos, o que pode estar implicado na patogénese do CP ou hiperplasia benigna da próstata (HBP).<sup>17,18,19</sup> Vários compostos esteróides têm vindo a ser sintetizados e avaliados no sentido de actuarem como inibidores da 5 $\alpha$ R. Destes, temos como exemplo, o finasteride, inibidor selectivo da 5 $\alpha$ R, primeiro inibidor da 5 $\alpha$ R aprovado nos EUA para o tratamento da HBP e CP<sup>19</sup>, sendo mesmo considerado o agente mais promissor na prevenção do CP.<sup>15</sup> Contudo, também se verificou que, o finasteride é capaz de reduzir a taxa de proliferação *in vitro* de linhas celulares de CP, tais como DU145 e PC-3.<sup>19</sup>

## 2.2 Esteróidogénese no organismo humano

O córtex supra-renal (figura 2) produz diversas hormonas esteróides principalmente o cortisol, a aldosterona e androgénios.<sup>20</sup>



**Figura 2.** Representação do córtex supra-renal.  
(Imagens retiradas da referência 20).

A esteroidogénese é um processo crucial para a homeostase dos sistemas biológicos. Numa ampla série ampla de esteróides biotransformados a partir do colesterol, os androgénios e estrogénios são moduladores-chave fisiológicos e fisiopatológicos, nomeadamente em doenças hormono-dependentes, especialmente no cancro do endométrio, CP e CM.<sup>21</sup>

As vias de síntese esteroidogénica supra-renal foram esclarecidas através da análise das enzimas esteroidogénicas. A maioria destas enzimas pertence à família das oxigenases do citocromo P450 (CYP450) (Tabela 1).<sup>20</sup>

A síntese de esteróides ocorre em diversos tecidos, mas tem sempre um precursor comum: o colesterol (Figura 3), que desempenha um papel importante em termos estruturais na maioria das membranas no organismo humano.<sup>22,23,24</sup>

Na mitocôndria da célula inicia-se a biossíntese dos androgénios. A conversão do colesterol a pregnenolona é o passo limitante da esteroidogénese supra-renal (figura 2), sendo o principal local de actuação da hormona adeno-corticotrófica (ACTH) na glândula supra-renal.<sup>20</sup> A pregnenolona é então transportada para o exterior da mitocôndria antes do reinício da síntese de esteróides.<sup>20</sup>

**Tabela 1.** Nomenclatura das enzimas esteroidogénicas.<sup>20</sup>

Enzima	Símbolo do gene	Nome trivial
P450scc	CYP11A1	Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
3 $\beta$ -Hidroxiesteróide desidrogenase	HSD3B1 HSD3B2	3 $\beta$ -Hidroxiesteróide desidrogenase
P450c17	CYP17	17 $\alpha$ -hidroxilase, 17,20-liase
P450c21	CYP21A2	21 $\beta$ -hidroxilase
P450 c11 $\beta$	CYP11B1	11 $\beta$ -hidroxilase
P450 c11AS	CYP11B2	P450aldo; aldosterona sintase; corticosterona metiloxidase

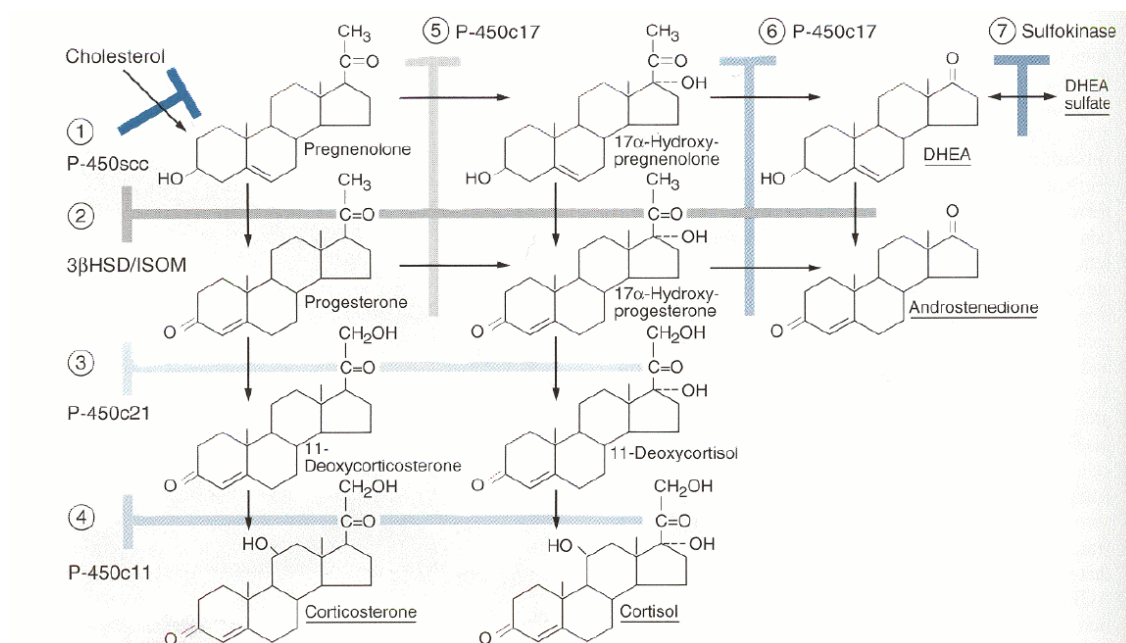
O gene CYP11A1, localizado no cromossoma 15, codifica a enzima colesterol desmolase (P450scc) que vai clivar a cadeia lateral do colesterol de modo a formar-se a pregnenolona. O gene CYP11B1, localizado no cromossoma 8, codifica a enzima P450c11, também mitocondrial, que medeia a 11 $\beta$ -hidroxilação que ocorre nas zonas fasciculada e reticularis. A pregnenolona, por sua vez, pode ser metabolizada pela isoforma do CYP17, formando-se a desidroepiandrosterona (DHEA) ou pela 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD), juntamente com a  $\Delta^{4,5}$ -isomerase, originando a progesterona que posteriormente é metabolizada também pela CYP17, formando a androstenediona (AD).<sup>20,25,26</sup>

Neste sistema reaccional, converte-se também o 11-desoxicortisol em cortisol e a 11-deoxicorticosterona a corticosterona. Na zona glomerulosa, o gene CYP11B2, também localizado no cromossoma 8, codifica a enzima P450aldo, também designada por aldosterona sintase, que medeia importantes reacções como a 11 $\beta$ -hidroxilação, 18-hidroxilação e a 18-oxidação, que converte a desoxicorticosterona a corticosterona, sendo esta convertida em 18-hidroxycorticosterona que, finalmente, é convertida em aldosterona.<sup>20,25,26</sup>

No retículo endoplasmático, o gene CYP17, localizado no cromossoma 10, codifica a enzima P450c17 que apresenta dupla actividade tanto de 17 $\alpha$ -hidroxilase bem como de C17,20-liase, ambas cruciais para a fisiologia humana, estando relacionadas com um só local activo.<sup>20,27</sup> A C17,20-liase faz a clivagem das suas cadeias laterais da 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona e da 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, originando-se posteriormente a DHEA e a AD, respectivamente.<sup>20,25,26</sup>

Em relação ao gene CYP21A2, sabe-se que induz a enzima P450c21 a realizar a 21-hidroxilação da progesterona e da 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona. A actividade 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase- $\Delta^{4,5}$  isomerase é mediada pela enzima P450 localizada no retículo endoplasmático liso.<sup>20</sup>

Por fim, nos testículos, a DHEA é convertida em testosterona. Esta é reduzida pela 5 $\alpha$ -redutase de modo a formar-se a DHT. Os estrogénios (estrone e estradiol) podem formar-se através da actuação do CYP450 aromatase (CYP19) sobre a T e AD.<sup>20,25,26</sup>

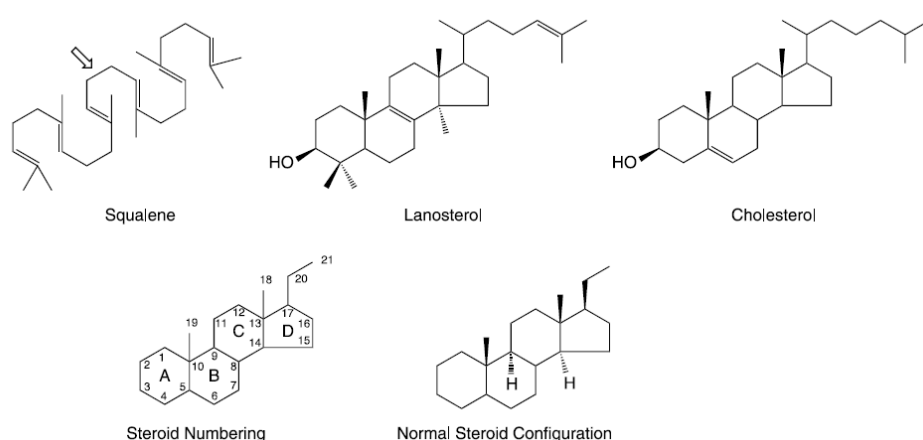


**Figura 3.** Esquema ilustrativo da esteroidogênese adrenal  
(Esquema retirado da referência 20).

## 2.3 Importância biológica e sintética de esteróides

Os esteróides compreendem um amplo grupo de compostos orgânicos naturais e sintéticos que compartilham de uma estrutura química semelhante com 17 átomos de carbono dispostos num sistema de quatro anéis.<sup>28</sup> O núcleo tetracíclico fundido (ciclopentanoperhidrofenantreno), característico dos esteróides, determina a estrutura carbonada das hormonas características de importantes grupos de mamíferos.<sup>29</sup>

Um dado relevante na química de esteróides é o sistema de numeração (figura 4). Este sistema idiosincrático de numeração deve-se ao facto de ter sido criado antes da estrutura do núcleo esteróide estar totalmente estabelecida.<sup>29</sup>



**Figura 4.** Sistema de numeração de esteróides.

(Imagens retiradas de “Strategies for Organic Drug Synthesis and Design, Second Edition. By Daniel Lednicer Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Inc.”).

Os compostos esteróides estão largamente distribuídos na natureza. Os organismos vivos, tanto vegetais como animais, apresentam na sua constituição esteróides, os quais desempenham um importante papel na sua actividade vital, tendo variadas funções, nomeadamente como hormonas<sup>30</sup>, reguladores fisiológicos<sup>30,31</sup>, provitaminas<sup>30</sup>, entre outras. Os esteróides estão inerentes à regulação das funções do nosso organismo, por exemplo, no metabolismo, digestão e no desenvolvimento e funcionamento dos órgãos sexuais. Estes contribuem para a digestão/absorção das gorduras (ácidos biliares), são precursores da vitamina D<sub>3</sub>, medeiam o desenvolvimento dos caracteres sexuais primários e secundários<sup>5</sup> e também participam na regulação fisiológica do metabolismo dos glúcidos e dos electrólitos (hormonas adrenocorticais).<sup>23</sup> Exemplos de esteróides envolvidos nestes funções vitais incluem os ácidos biliares, os corticosteróides (glicocorticóides e mineralocorticóides) e os esteróides sexuais (progestogénios, androgénios e estrogénios).<sup>28</sup> As hormonas sexuais masculinas designam-se por androgénios (ex.: androstenodiona e testosterona). As hormonas sexuais

femininas, por sua vez, são os estrogénios (ex.: estrona e estradiol) e os progestagénios (progesterona).<sup>23</sup>

A presença de diferentes grupos funcionais no núcleo tetracíclico fundido característico deste grupo de compostos, é que explica que os esteróides interajam com diversos alvos no organismo humano e, por isso, que tenham diversas acções biológicas.<sup>32</sup>

O desenvolvimento desta classe de compostos levou a um importante avanço na química medicinal. Na verdade, os esteróides formam, provavelmente, um dos grupos de produtos naturais mais investigados nas últimas décadas.<sup>22,33</sup>

Ao longo das últimas décadas, centenas de compostos esteróides foram isolados de fontes naturais e vários milhares foram obtidos por via sintética. Este interesse mantém--se actualmente, com intensa investigação no sentido de isolar e identificar novos compostos esteróides naturais com novas actividades biológicas. Além disso, muitos esteróides sintéticos são usados na terapêutica de diversas patologias, como cancros hormono-dependentes, nomeadamente os inibidores da aromatase no tratamento endócrino do cancro da mama e os esteróides com actividade antiandrogénica no tratamento endócrino do cancro da próstata. Adicionalmente, diversos estrogénios, progestagénios e outros esteróides são usados em terapêuticas de problemas hormonais variados. Muito conhecidos são também os esteróides sintéticos utilizados como contraceptivos orais, os corticosteróides anti-inflamatórios, os esteróides anabolizantes, os neurosteróides e os ácidos biliares.<sup>33</sup> É importante referir que, a síntese de esteróides é dispendiosa, o que leva os investigadores a darem relevância significativa ao desenvolvimento de reacções quimio-, estereo- e regioselectivas destes compostos.<sup>33</sup>

## 2.4 Obtenção de esteróides

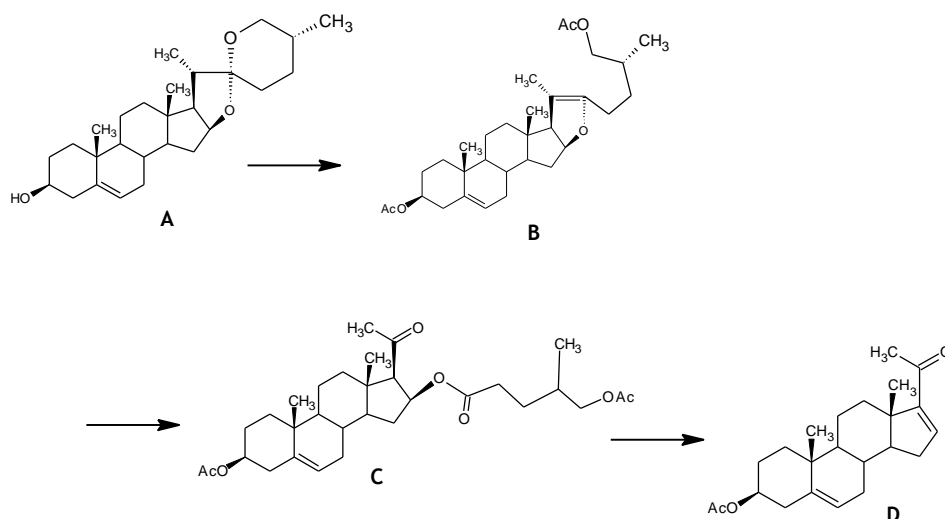
Apesar de muitas das principais classes de esteróides poderem ser obtidas por síntese total, a maioria destas é obtida por síntese parcial a partir de produtos naturais que contêm o núcleo esteróide.<sup>34</sup>

Os esteróides são substratos funcionalizáveis utilizados, no âmbito da indústria química farmacêutica, como materiais de partida para a síntese de muitas moléculas biologicamente activas. A síntese destes pode ser realizada por vias microbiológicas e químicas.<sup>30,31</sup> A maior parte da síntese de esteróides é realizada por diferentes vias químicas a partir de apenas duas espécies de plantas: raiz de inhame mexicano selvagem, *Discorea macrostachy* (planta da família das Discoriáceas), e sementes de soja.<sup>29,34</sup>

Antes dos anos 40 do século XX existiam muitas dificuldades na investigação de esteróides, devido às dificuldades de obtenção destes compostos isolados e puros em quantidades significativas.<sup>29,34</sup> Assim, estas dificuldades de obtenção destes compostos aliadas à necessidade de síntese de compostos quimicamente modificados, levaram à pesquisa intensiva de esteróides, principalmente em fontes como as plantas.<sup>29</sup> De facto, Marker e colaboradores, na década de 40, descreveram a preparação do acetato de 16-desidropregnenolona (16-DHP Ac.) através da degradação controlada da cadeia lateral da diosgenina<sup>29,34,35,36</sup>, facilmente isolada da raiz de inhame mexicano selvagem. Este procedimento, designado por degradação de Marker, marcou o início de uma intensa investigação em química de esteróides, a qual se verificou nos anos seguintes, uma vez que o acetato de 16-desidropregnenolona pode, por sua vez, ser modificado quimicamente originando uma elevada variedade de esteróides, nomeadamente a progesterona e androgénios.<sup>29,34,36</sup> Assim, uma vez que a 16-DHP Ac. é um intermediário de extrema importância no processo de síntese de compostos esteróides, têm vindo a ser desenvolvidos, por vários grupos de investigação, métodos sintéticos que visam a obtenção mais eficiente deste substrato específico.<sup>36</sup>

De acordo com a literatura, o processo clássico de síntese da 16-DHP Ac. a partir da diosgenina (obtida do inhame mexicano selvagem), por degradação controlada da sua cadeia lateral, leva a um rendimento final que varia de 65 a 69%<sup>37,38</sup> e está representada na figura 5.





**Figura 5.** Síntese simplificada da 16-DHP Ac. (D) a partir da diosgenina (A).

A etapa chave nesta síntese envolve a acetólise da diosgenina (A) formando-se a pseudodiosgenina (B) (Figura 5).<sup>34</sup>

Mićović *et al.*, (1990) relatou uma preparação simples da 16-DHP Ac. a partir da diosgenina usando condições de pressão normal e temperatura mais reduzida que no processo original. Este processo seguiu a seguinte sequência (figura 6)<sup>33,37</sup>:

- Tratamento da diosgenina (A) com anidrido acético durante 10 horas a 135°C, formando-se a pseudosapogenina acetato (B).
- Oxidação usando trióxido de crómio em anidrido acético, que leva à formação do ceto-enol (C).
- O aquecimento do composto C em meio ácido ou alcalino promove a formação da 16-DHP acetato (D).

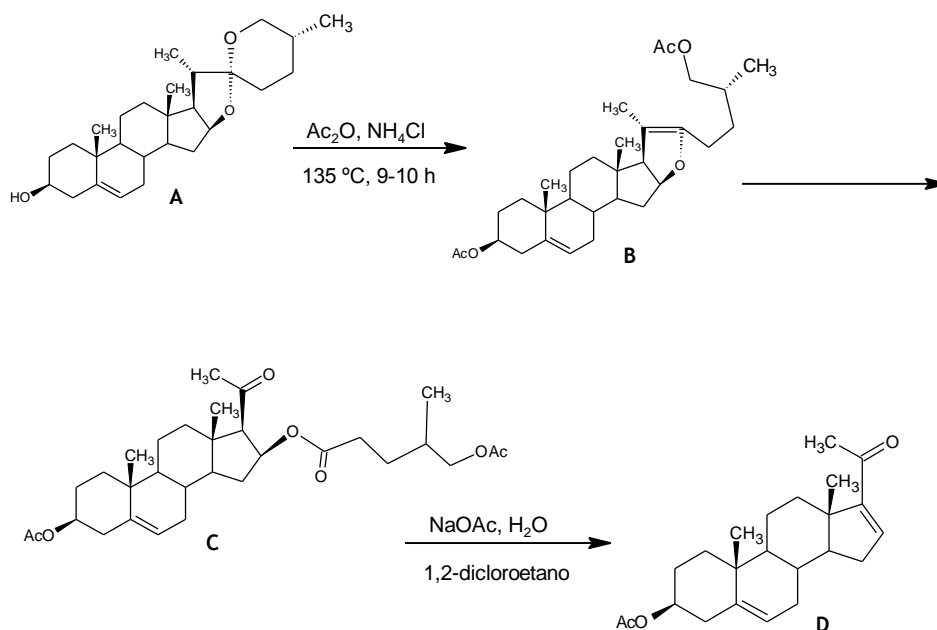


Figura 6. Síntese simplificada da 16-DHP Ac. a partir da diosgenina elaborada por Mićović *et al.*, (1990).

Mais recentemente, Goswami (2003) desenvolveu um processo simples de obtenção da 16-DHP Ac. a partir da diosgenina com um rendimento superior a 70%, através da substituição do agente oxidante altamente tóxico (trióxido de cromo), por permanganato de potássio na presença de iodeto de tetraetilamónio. A reacção decorre a pH 3 e a uma temperatura entre 0 e  $5^\circ\text{C}$  (figura 7). Sob estas condições reaccionais, conseguiu-se clivar a olefina do anel dihidrofurano de forma a obter-se a 16-DHP Ac., mantendo-se a dupla ligação 5,6 mantém-se completamente intacta.<sup>36</sup>

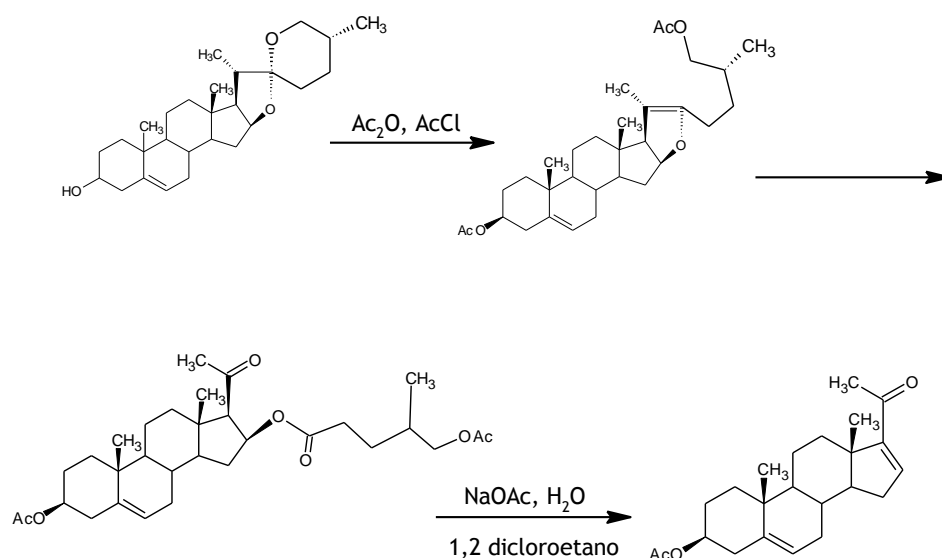
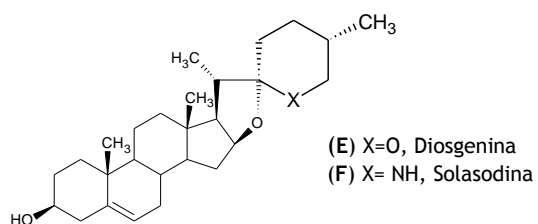


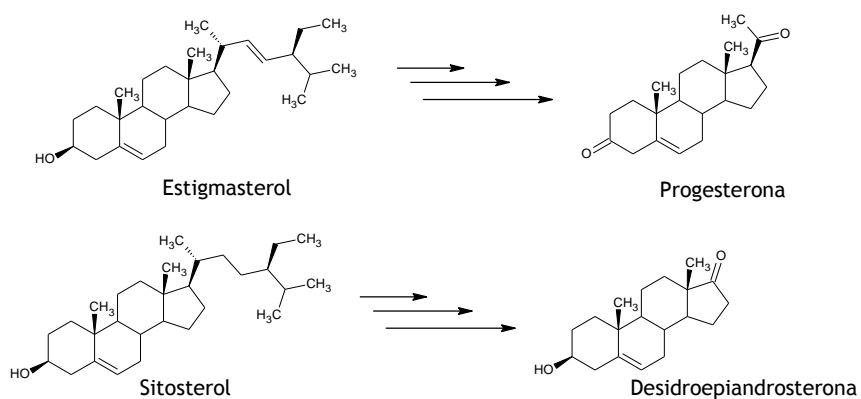
Figura 7. Síntese simplificada da 16-DHP Ac. a partir da diosgenina relatada por Goswami (2003).

Na obtenção da 16-DHP Ac., em alternativa à diosgenina, pode também ser utilizada a solasodina (figura 8), que tem estrutura similar.<sup>36</sup>



**Figura 8.** Estrutura química da Diosgenina e Solasodina.

Actualmente também é conhecida uma forma alternativa de obtenção de esteróides, a partir das sementes de soja, as quais são muito abundantes.<sup>22,34,38</sup> A fracção insaponificável do óleo de sementes de soja é conhecida por ser rica numa mistura de esteróides com dez átomos de carbono na cadeia lateral ligada à posição 17,<sup>34</sup> que inclui o estigmasterol e o sitosterol.<sup>22,34</sup> Assim, a progesterona pode obter-se, de modo eficiente e económico, a partir do estigmasterol (figura 9) por via química.<sup>22,34,39</sup> Por outro lado, por via enzimática, é possível converter sitosterol em vários tipos de androgénios, principalmente a desidroepiandrosterona (figura 9), um esteróide abundante no sangue humano.<sup>22,34,39</sup>



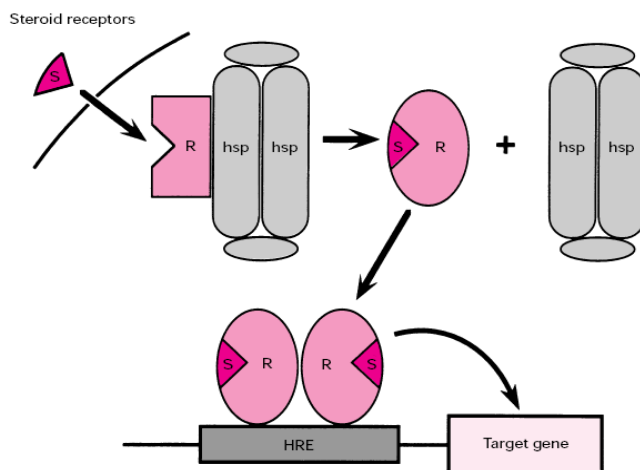
**Figura 9.** Exemplo de esteróides obtidos a partir de sementes de soja.

## 2.5 Tratamento de tumores hormono-dependentes

Actualmente, estão na fase de ensaios clínicos novos tratamentos e novas associações de tratamentos destes tipos de cancro prevalentes na nossa sociedade.<sup>40</sup>

Os esteróides têm a capacidade de regular vários processos biológicos e, por isso, têm um enorme potencial no que diz respeito ao *design* e desenvolvimento de novos fármacos no tratamento de um vasto número de doenças, tais como os tumores cerebrais, da próstata e da mama, osteoporose, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, entre outras.<sup>32</sup>

As hormonas esteróides actuam nas células alvo essencialmente regulando a expressão génica e a síntese proteica. Estas hormonas são lipofílicas, sendo transportadas na corrente sanguínea maioritariamente ligadas, de modo reversível, a proteínas séricas.<sup>41</sup> Os esteróides livres podem difundir-se através da membrana celular e assim entrarem nas células. As células sensíveis a determinada hormona esteróide (células alvo), contêm receptores de esteróides (figura 10), que são proteínas intracelulares solúveis<sup>41</sup>, membros de uma família vasta de factores de transcrição nucleares ligando-activados onde constam os receptores de esteróides (da progesterona (PRs), dos androgénios (ARs), estrogénios (ERs), glucocorticóides (GRs) e mineralocorticóides) e os receptores específicos das hormonas tiroideias, de retinóides e da vitamina D.<sup>42</sup>



**Figura 10** - Activação do receptor esteróide.

Através do avanço do conhecimento científico, conseguiu-se desenvolver diversas formas de prevenção e tratamento de muitos tipos de cancro, nomeadamente o CM. Embora de uso terapêutico relativamente recente, existem substâncias que conseguem bloquear a acção estrogénica e são dotadas de reduzida toxicidade, e por conseguinte, têm vindo a ser utilizadas no tratamento de primeira linha na terapêutica hormonal do CM dependente de estrogénios, incluindo na fase metastática da doença. Estas substâncias (designadas anti-

estrogénios) actuam como inibidores competitivos da ligação do estradiol aos receptores de estrogénios.<sup>42</sup> Como exemplo destes fármacos temos o tamoxifeno e o fulvestrant, que são importantes agentes terapêuticos usados no tratamento do CM.<sup>43,44,45</sup>

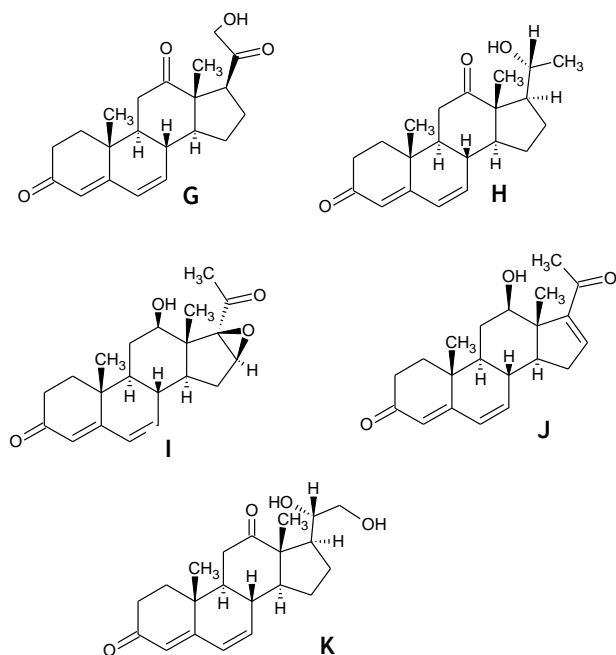
Numerosos esteróides sintéticos têm vindo a ser desenvolvidos no sentido de melhorar a terapêutica destas patologias. O aperfeiçoamento das propriedades de ligação destes compostos ao alvo biológico tem sido um desafio que tem levado os investigadores a desenvolver compostos em que a ligação ao alvo esteja melhorada. Outras estratégias neste contexto de tratamento de tumores hormono-dependentes, incluindo o cancro da próstata incluem, além do já referido bloqueio dos receptores hormonais, a inibição de enzimas envolvidas na biossíntese de esteróides, já referidas na introdução desta dissertação. Exemplos incluem o anastrozole, letrozole e 4-hidroxiandrostenediona, que são inibidores da enzima aromatase (CYP19), utilizados na terapêutica do cancro da mama estrogénio-dependente. No contexto da terapêutica do cancro da próstata androgénio-dependente utilizam-se, de modo análogo ao que acontece no cancro da mama, antiandrogénios, nomeadamente a flutamida e a bicalutamida (não-esteróides) e o acetato de ciproterona (esteróide). Além destes, na terapêutica deste tipo de tumores também se utilizam fármacos como o liarozole e o fluconazole (não-esteróides) e o acetato de abiraterona (esteróide) que actuam inibindo a enzima CYP17.<sup>46</sup>

## 2.6 Exemplos de esteróides da classe pregnano bioactivos

Os esteróides da série pregnano (C-21) são uma importante classe de compostos bioactivos que apresentam variadas actividades farmacológicas, o que tem proporcionado um elevado interesse no desenvolvimento de novos fármacos. Exemplos de compostos desta série, incluem alguns pregnanos glicosilados, conhecidos da medicina tradicional chinesa e isolados principalmente da família de plantas *Asclepiadaceae*, que apresentam importantes actividades farmacológicas designadamente anticancerígenos, anti-asmáticas, antifúngicas, entre outras.<sup>46</sup>

Como já referido, alguns esteróides pregnanos bioactivos têm sido descobertos no âmbito da medicina tradicional. Neste contexto, compostos isolados da planta *Solanum lyratum* têm sido usados no tratamento de vários tipos de tumores humanos. Esta planta apresenta na sua constituição glucuronidos esteróides, glucósidos alcalóides esteróides, coumarina, ácido fenólico e outros compostos, e foi já reportado que o extracto aquoso da mesma apresenta uma relevante citotoxicidade sobre células de leucemia promielocítica humanas HL-60.<sup>48</sup> De forma a avaliar de modo sistemático os constituintes desta planta no que toca à sua potencial actividade citotóxica, isolaram-se fracções bioactivas da mesma através de um processo de fraccionamento do extracto etanólico desta planta guiado pela bioactividade. Desta forma, a 16-desidropregnenolona e a pregnenolona foram isoladas pela primeira vez a partir da planta *Solanum lyratum*. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, a 16-desidropregnenolona isolada apresenta uma importante actividade citotóxica para as linhas celulares do carcinoma uterino humano (Hela), do melanoma maligno humano (A375-S2) e apresenta um efeito mais moderado nas linhas de células do cancro gástrico humano (SGC-7901) e do carcinoma hepatocelular humano (Bel-7402). Sun LX, et al. (2006) afirmaram que, até à data, este era o único dado de citotoxicidade relativo à 16-desidropregnenolona em linhagens de células de vários tipos de cancro.<sup>48</sup>

A partir da planta denominada *Nerium Oleander L.* (Apocynaceae) também foram isolados compostos pregnanos bioactivos. Tal como as plantas acima referidas, também plantas desta espécie têm vindo a ser usadas na medicina tradicional, uma vez que apresentam propriedades de extrema relevância em termos terapêuticos incluindo antibacterianas, anti-cancerígenas, e cardiotónicas.<sup>49</sup> Num estudo recente, foi reportado o isolamento e caracterização de cinco pregnanos a partir da raiz desta planta (figura 11): 21-hidroxipregna-4,6-dien-3,12,20-triona (G), 20R-hidroxipregna-4,6-dien-3,12-diona (H), 16B,17B-epoxi-12B-hidroxipregna-4,6-dien-3,20-diona (I), 12B-hidroxipregna-4,6,16-trien-3,20-diona (J), 20S,21-dihidroxipregna-4,6-dien-3,12-diona (K).

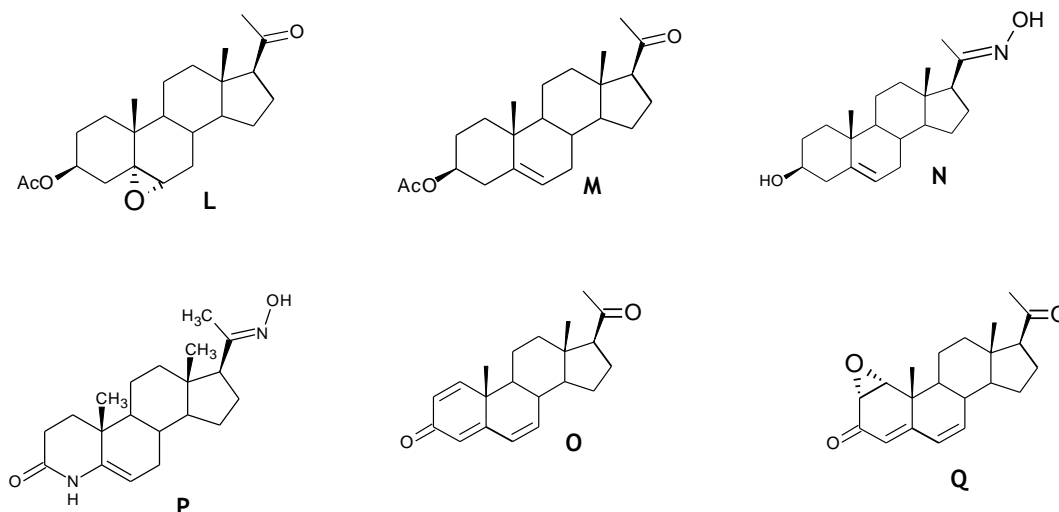


**Figura 11.** Compostos pregnano esteróides bioativos.

No estudo acima referido também foi efectuada a avaliação da actividade citotóxica dos compostos **G-K** sobre 4 linhas de células humanas: células de fibroblastos humanos não-tumorais (WI-38), células de tumor maligno induzido a partir das células WI-38 (VA-13) e células tumorais de fígado humano (HepG2). Através deste estudo, conseguiu-se verificar a significativa capacidade do composto **K** para inibir o crescimento celular das células VA-13 e HepG2. Este facto é relevante uma vez que este composto evidenciou uma citotoxicidade relativamente inferior para as células normais de fibroblastos em relação, por ex., às células VA-13.<sup>47</sup> Estes compostos têm muitas semelhanças estruturais entre si, mas como se pode verificar existem diferenças significativas no que diz respeito à sua bioactividade, verificando-se, por exemplo, que o grupo funcional 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -epóxido como substituinte nas posições 16 e 17 da molécula não pareceu ser importante quanto à inibição do crescimento de células tumorais. Contudo, o composto **J**, muito semelhante ao anterior, apresenta propriedades interessantes no combate ao crescimento de células tumorais, que são consequência da existência de uma olefina conjugada nas posições 16 e 17 do núcleo esteróide deste pregnano bioactivo.<sup>47</sup>

No âmbito da importância dos compostos pregnano esteróides no tratamento de tumores hormono-dependentes, mais propriamente no CP, está relatado que algumas 20-oximas esteróides são inibidoras das enzimas CYP17 e 5 $\alpha$ -redutase.<sup>48</sup> O 3 $\beta$ -acetoxi-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxipregnan-16-eno-20-ona, que não apresenta uma olefina nos anéis A ou B, bem como a 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -epoxiprogesterona, apresentam uma maior capacidade de inibição da enzima 5 $\alpha$ -

redutase relativamente ao finasteride.<sup>19</sup> Com base nestes dados específicos, Kim, S. e E. Ma (2009) descreveram a síntese de várias 20-oximas e/ou epoxipregnanos, pregnenos e pregnadienos (figura 12), avaliando posteriormente a sua capacidade de inibição da enzima 5 $\alpha$ -redutase e a sua citotoxicidade *in vitro* sobre duas linhas celulares de cancro da próstata: LNCaP (androgénio-dependente) e PC-3 (androgénio-independente).<sup>19</sup> Os compostos que se revelaram mais citotóxicos foram o composto P, contendo um grupo oxima em C20 e o R, com um grupo 1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -epóxido.<sup>19</sup>



**Figura 12.** Exemplos de compostos sintetizados e avaliados nas células LNCaP e PC-3 por Ma e Kim (2009)

Actualmente, também se conhecem muitos esteróides isolados de diferentes organismos marinhos que têm diversas actividades biológicas relevantes. Alguns deles são mesmo extremamente tóxicos contra células tumorais, mostrando também efeitos anti-inflamatórios, entre outros. Portanto, não é surpreendente que os esteróides “marinhos” também despertem o interesse, não só de químicos, mas também de farmacêuticos e médicos.<sup>49</sup> Num estudo com objectivo de pesquisar mais compostos bioactivos de origem marinha, Quang (2011), através da análise de um extracto metanólico de *L. laevigatum*, isolou vários esteróis, incluindo dois metabolitos conhecidos, como a pregnenolona e o colesterol. Inicialmente avaliou-se a citotoxicidade destes compostos contra linhas celulares cancerígenas de pulmão (A549), cólon (HCT-116) e de leucemia (HL-60), conhecidas linhas de células cancerígenas. Contudo, verificou-se que tanto a pregnenolona como o colesterol foram inactivos para todas estas linhas celulares.<sup>49</sup> Apesar deste resultado, a pregnenolona, um esteróide natural, precursor da síntese de outras hormonas importantes no nosso organismo, foi recentemente descrita como tendo actividade anti-tumoral contra células HepG2, embora não se tenha revelado citotóxico contra células MDA-MB-231 (de cancro da mama). Além disso, este esteróide pode ser usado como *template* no desenvolvimento de compostos anticancerígenos. Neste estudo, por modificação do anel D da pregnenolona



prepararam-se vários compostos com actividades anti-tumorais interessantes, nomeadamente derivados benzilidenos, pirazolinas, pirazóis, hidrazonas, oximas, entre outros.<sup>50</sup>

Num outro estudo recente, Shan et al. (2009) avaliaram a capacidade de vários esteróides pregnanos, incluindo a pregnenolona, inibir a capacidade de proliferação de uma linha celular cancerígena de esófago humana (EC-90) e concluiu que este composto apresentou alguma capacidade de inibição deste tipo de células cancerígenas (13,6 % de inibição).<sup>51</sup> Adicionalmente, os esteróides 16 $\alpha$ -metil-2-oxopregn-5-eno-3 $\beta$ -il acetato e o seu derivado 3 $\beta$ -hidroxilado foram recentemente preparados e caracterizados, tendo revelado ter uma acção antiproliferativa marcada contra células de cancro gástricas (MGC-803).<sup>52</sup>

Por fim, é importante referir que estes resultados fornecem informações úteis na descoberta e desenvolvimento de compostos químicos mais bioactivos; especialmente reforçam a ideia de que os esteróides da classe pregnano, funcionalizados no anel D, podem apresentar relevantes actividades anti-tumorais.



## 3. Objectivos

### 3.1 Objectivo geral

O objectivo geral deste trabalho consiste em preparar e avaliar os efeitos de diferentes concentrações de compostos esteróides da série pregnano na proliferação de células cancerígenas, pretendendo-se desenvolver e caracterizar potenciais novos agentes antitumorais.

### 3.2 Objectivos específicos

- Estudo da informação existente sobre a relação entre as estruturas em causa já conhecidas e a sua actividade anticancerígena.
- Design, síntese e caracterização estrutural de séries de esteróides da série pregnano, funcionalizados no anel D e 20-oximas.
- Avaliação *in vitro* dos efeitos destes compostos na proliferação de células do cancro da mama (MCF-7 - *Michigan Cancer Foundation - 7*) e próstata (LNCaP - *Lymph node carcinoma of the prostate*) e em fibroblastos “normais” da derme humana (NHDF - *Normal Human Dermal Fibroblasts*), através de ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).
- Comparação dos resultados obtidos, nas diferentes linhagens, de modo a verificar a selectividade na acção citotóxica das moléculas sintetizadas.
- Estabelecimento de um perfil de relação estrutura-acção antiproliferativa/citotóxica nestas células e condições experimentais.



## 4. Parte experimental

### 4.1 Síntese química

#### 4.1.1 Materiais:

Todos os compostos comercialmente disponíveis foram usados conforme foram recebidos. Os esteróides acetato de 16-desidropregnenonolona e acetato de pregnenolona, foram adquiridos à Sigma Aldrich. Os sólidos como sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) e sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro) foram adquiridos à Merck, o hidróxido de sódio comercial (NaOH) à José M. Vaz Pereira, S.A. (JMGS), o hidróxido de potássio (KOH) à Pronalab, o permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) (99 %) à Riedel de Haën, a 4-dimetilaminopiridina (DMAP) à FLUKA, e os sólidos como tiosulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloridrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}.\text{HCl}$ ) bem como o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) foram adquiridos à Sigma Aldrich.

Em relação aos solventes necessários à realização deste trabalho, o metanol 99%, o acetato de etilo 99,5%, o diclorometano e o etanol absoluto foram adquiridos à VWR Prolabo; o ácido fórmico foi adquirido à BDH Chemicals, o ácido clorídrico 37% à CARLO ERBA Reagents, a acetona pura à JMGS, a piridina à BD Biosciences. Os restantes solventes usados no decorrer deste trabalho, tais como, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), e os reagentes peróxido de hidrogénio 30%, monohidrato de hidrazina, e anidrido acético 98% foram também adquiridos à Sigma Aldrich.

#### 4.1.2 Separação:

Para a análise por cromatografia em camada fina (CCF) foram usadas placas comerciais Kieselgel 60  $F_{254}$ , da Merck. As placas foram observadas à luz ultra-violeta (254 nm) e reveladas usando a mistura etanol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95:5), seguindo-se um aquecimento em placa a 120°C. Em geral, as reacções foram seguidas por CCF, sendo o eluente indicado na proporção v/v de solventes.

Para a cromatografia em coluna *flash* foi utilizado gel de sílica (230-400 Mesh, Merck), sendo o eluente indicado na proporção v/v de solventes.

#### 4.1.3 Instrumentos e equipamento:

Os espectros de infra-vermelho (IV) foram obtidos num espectrofotómetro Nicolet iS10 (Thermo Scientific), e foram efectuados pelo método ATR. Os dados destes espectros indicam-se pela frequência máxima, expressa em  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de RMN foram obtidos num espectrofotómetro Bruker Avance III 400 e registados a 400 MHz para  $^1\text{H}$  RMN e a 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  RMN. Nos espectros obtidos usou-se clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente. Os dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN estão indicados pela ordem seguinte: solvente, desvio químico em ppm, multiplicidade e atribuição da molécula. Os dados de  $^{13}\text{C}$  RMN estão indicados pela ordem: solvente, desvio químico e carbono respectivo.

#### 4.1.4 Procedimento experimental:

A nomenclatura dos compostos orgânicos referenciados nesta dissertação seguiu genericamente as recomendações descritas em Fernandes, A. C.; Herold, B.; Maia, H.; Rauter, A. P.; Rodrigues, J. A. R. *Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*, Tradução Portuguesa nas Variantes Europeia e Brasileira, Lidel: Lisboa-Porto-Coimbra, 2002. No entanto, ao longo desta dissertação, alguns esteróides são designados de forma abreviada ou usando nomes triviais.

Os detalhes da síntese destes compostos foram previamente descritos na literatura.

##### 4.1.4.1 Síntese da 16-desidropregnenolona **2** <sup>27,53,54</sup>

Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se o substrato **1** (178,255 mg; 0,5 mmoles) em metanol (4 ml) à temperatura ambiente, com agitação magnética. De seguida, adicionou-se uma solução aquosa de KOH 10 % (1,35 ml) em metanol. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:2) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 2 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha principal, correspondente ao produto de reacção de  $R_f$  0,53 e com absorção UV, e também uma mancha relativa a um produto secundário e a vestígios de um outro produto secundário minoritário e de matéria-prima inalterada. A mistura da reacção foi concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo. De seguida, juntou-se diclorometano (75 ml) e água (10 ml) ao pó resultante, ficando esta mistura sob agitação magnética durante cerca de 2 horas. A fase aquosa foi novamente extraída com diclorometano (2 x 50 ml). Quanto à fase orgânica total foi lavada com água (10 ml), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura, obtendo-se uma mistura de composto **1** e alguns vestígios de produto secundário e de matéria-prima inalterada 152 mg (96,583 % - rendimento calculado em

relação ao produto principal da reacção). Esta mistura foi submetida a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:4) tendo-se obtido o composto **1** puro.

O produto bruto da reacção foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN.<sup>53</sup> IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3427, 3044, 2930, 1651, 1371, 1055;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 0,85 (3H, s,  $\text{H}_3$ -18), 0,98 (3H, s,  $\text{H}_3$ -19), 2,19 (3H, s,  $\text{H}_3$ -21), 3,456 (1H, m, H-3), 5,29 (1H, dd, H-6), 6,71 (1H, dd, H-16);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 71.92 (C-3), 141.56 (C-5), 121.24 (C-6), 144.8 (C-16), 197,17 (C-20).

#### 4.1.4.2 Síntese do 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona **3**<sup>55</sup>

Num balão de fundo redondo de 25 ml dissolveu-se o substrato **1** (356,51 mg; 1 mmol) em metanol (23,88 ml) arrefecido a 15°C. Adicionou-se lentamente uma solução de NaOH 4N (0,71 ml) e, imediatamente, de seguida uma solução de peróxido de hidrogénio 30% (1,43 ml). A mistura foi deixada dentro do balão (não fechado, com a rolha a não fechar por completo o balão), no frigorífico, durante 24 horas. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 18 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se apenas uma mancha correspondente ao produto de reacção, com  $R_f$  0,64.

Após o término da reacção, transferiu-se a solução para um balão de maiores dimensões para adicionar 50 ml de água fria. De seguida, filtrou-se esta mistura com um funil de büchner e kitasato e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (3 x 30 ml). Adicionalmente, também se dissolveu o sólido retido no filtro em acetato de etilo (cerca de 10 ml), que se juntou às 3 fracções de acetato de etilo da extracção. Quanto à fase orgânica, foi lavada com uma solução aquosa de ácido clorídrico a 5% (25 ml), uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 10% (20 ml) e água (2 x 25 ml). Por fim, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se até à secura com o auxílio de um evaporador rotativo, obtendo-se o produto final **3** (318,4 mg; 96,336 %).

O produto bruto da reacção foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN.<sup>56</sup> IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3333, 3030, 2950, 2863, 1700, 1634, 1453, 1380, 1322;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$ : 0,989 (3H, s,  $\text{H}_3$ -18), 1.015 (3H, s,  $\text{H}_3$ -19), 1,998 (3H, s,  $\text{H}_3$ -21), 3.58 (1H, m, H-3), 3.648 (1H, s, H-15), 5.299 (1H, m, H-6);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$ : 71,64 (C-3), 141,14 (C-5), 121,0 (C-6), 60.53 (C-16), 205,01 (C-20).

#### 4.1.4.3 Síntese do 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxipregn-5-en-20-ona **4**<sup>57</sup>

Num banho de parafina a 50 °C, colocou-se um balão de 50 ml ao qual se adicionou o substrato da reacção, **3**, (82,6275 mg; 0,025 mmol) que foi dissolvido em etanol absoluto (4,16 ml). Após a dissolução total do esteróide, adicionou-se cerca de 0,139 ml de água destilada e por último 0,55 ml de hidrato de hidrazina. O controlo de reacção por TLC

(eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 2 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção com Rf 0,2, e também vestígios de matéria-prima inalterada.

De seguida, neutralizou-se a reacção com a adição de uma solução de ácido clorídrico 10 % (10 ml). Depois colocou-se a mistura na ampola de decantação e lavou-se com diclorometano (3 x 30 ml) usado para fazer extracções. De seguida, lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 25 ml) e seca no fim com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura, obtendo-se uma mistura: composto 1 e alguns vestígios de matéria-prima inalterada (63,2 mg; 76,028 %). Esta mistura foi submetida a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:4) tendo-se obtido o composto 4 puro.

O produto bruto da reacção foi analisado por IV, <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN.<sup>57</sup> IV (cm<sup>-1</sup>): 3315, 3032, 2936, 2854, 1699, 1433, 1354, 1194, 1166, 1042, 948, 868; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)δ: 0.626 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 0,982 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 2.158 (3H, s, H<sub>3</sub>-21), 3.45 (1H, m, H-3), 4.83 (1H, t, H-16), 5.33 (1H, d, H-6); <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 73.97 (C3), 140.977 (C5), 121.48 (C6), 71.87 (C16), 208.71 (C20);

#### 4.1.4.4 Síntese do acetato de 16α,17α-epoxi-20-oxopregn-5-en-3β-ilo 5<sup>55</sup>

Num balão de fundo redondo de 25 ml, com um take-off contendo sílica activada, dissolveu-se o substrato 4 (288,06 mg; 0,77 mmol) em THF (7 ml), com agitação magnética. De seguida, adicionou-se uma solução de anidrido acético (0,1 ml) e o catalisador 4-dimetilaminopiridina (15 mg). O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 3 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de Rf 0,817, e também vestígios de matéria-prima inalterada (não detectada no espectro de RMN).

Após o término da reacção, evaporou-se o THF em evaporador rotativo e, de seguida, redissolveu-se a mistura resultante em diclorometano (250 ml) e transferiu-se esta solução para uma ampola de decantação, lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa de ácido clorídrico 10% (40 ml), uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (40 ml) e água (2 x 20 ml). Por fim, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se até à secura, obtendo-se o produto final 5 (286,7 mg; 99,528 %).

O produto bruto da reacção foi analisado por IV, <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN.<sup>58</sup> IV (cm<sup>-1</sup>): 2935, 2855, 1732, 1435, 1372, 1242, 1038; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)δ: 1,005 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 1.018 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 1,999 (3H, s, H<sub>3</sub>-21), 3.647 (1H, s, H-15), 4,61 (1H, m, H-3), 5,324 (1H, m, H-6); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)δ: 170.7 (C-3), 140,238 (C-5), 122,151 (C-6), 60.69 (CH-16), 205,139 (C-20).



#### 4.1.4.5 Síntese do acetato de 16 $\alpha$ -hidroxi-20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -ilo 6<sup>57</sup>

Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se, a 50 °C, o substrato 5 (293 mg; 0,786 mmoles) em etanol (13,1 ml) e adicionou-se água (436,64  $\mu$ l) e hidrato de hidrazina (1,73 ml). A reacção seguiu o mesmo procedimento descrito na secção 4.1.4.3.

O rendimento final do processo foi de 90,979 % 268 mg de mistura.

O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 2 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Contudo, observou-se a existência de uma mistura de compostos, que mais tarde se concluiu serem os compostos 4 e 6. A mancha relativa ao acetato de 16 $\alpha$ -hidroxi-20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -ilo acetato (6) apresentou um R<sub>f</sub> de 0,47, e a relativa ao 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihidroxi-pregn-5-eno-20-ona (4) de r<sub>f</sub> de 0,2. Esta mistura foi submetida a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:1) tendo-se obtido os compostos 4 e 6 numa proporção aproximada de 1:2 (70 mg de composto 4 : 122 mg de composto 6)

O composto 6 puro foi avaliado por IV, <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN.<sup>57</sup> IV (cm<sup>-1</sup>): 3501, 3022, 2926, 1729, 1695, 1356, 1053; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) $\delta$ : 0.623 (3H, s, 18-Me), 0,992 (3H, s, 19-Me), 2.156 (3H, s, 21-Me), 2.50 (1H, d, 17-H), 4.55-4.63 (1H, m, 3-H), 4.8 (1H, t, 16-H), 5.35 (1H, d, 6-H); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) $\delta$ : 208,70 (20-C=O), 170.755 (3-OCOCH<sub>3</sub>), 139.899 (5-C), 122.397 (6-C), 72.380 (C16);

#### 4.1.4.6 Síntese do acetato de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dihidroxi-20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -ilo 7<sup>59</sup>

Prepararam-se 2 soluções distintas. Num balão de 50 ml, dissolveu-se o substrato 1 (178,255 mg; 0,5 mmoles) em 23,92 ml de acetona pura e 95,6  $\mu$ l de ácido fórmico. De seguida, pulverizou-se uma porção suficiente de permanganato de potássio com o auxílio de um almofariz de porcelana, da qual se dissolveram cerca de 111,64 mg em 1,994 ml de água destilada e 7,974 ml de acetona num erlenmeyer de 50 ml. Arrefeceram-se ambas as soluções a 0 °C, e de seguida transferiu-se a solução de KMnO<sub>4</sub>, de forma rápida, para o balão onde se encontrava a solução de esteróide, agitando-se a mistura até esta adquirir uma tonalidade acastanhada (cerca de cinco minutos). De seguida, adicionaram-se 5 ml de uma solução aquosa a 10% de tiossulfito de sódio à mistura reaccional, e procedeu-se à filtração desta com o sistema büchner e kitasato, recolhendo-se no fim a fase orgânica límpida. De forma a aumentar o rendimento do processo, lavou-se o balão da reacção com acetona (3 x 10 ml) e filtrou-se pelo mesmo sistema. De seguida, com o auxílio do evaporador rotativo, evaporou-se a acetona da solução recolhida da filtração e transferiu-se a solução obtida para uma ampola de decantação e extraiu-se com 3 x 50 ml de acetato de etilo. Após este passo, lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (2 x 20 ml) e água destilada (2 x 20 ml). Por fim, secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrou-se e

evaporou-se até à secura obtendo-se o produto final **7** (182 mg; 93,207 %), o qual se identificou por TLC (eluente: acetato de etilo-éter de petróleo 1:1) com um Rf de 0,71.

O produto bruto da reacção foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN.<sup>59</sup> IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3469, 3420, 3035, 2936, 1730, 1225, 1026;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) $\delta$ : 0.626 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 0,982 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 2.001 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 2.222 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 3,797 (1H, t, 17H), 4.55-4.59 (1H, m, H-3), 5,03 (1H, t, H-16), 5.34 (1H, d, H-6);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) $\delta$ : 170,766 (C3), 139,903 (C5), 122,393 (C6), 72,69 (C16), 211,45 (C20).

#### 4.1.4.7 Síntese da oxima da 16-desidropregnenolona acetato **8**<sup>60</sup>

Num balão de fundo redondo de 50 ml, dissolveu-se o substrato **1** (16-DHP Ac.) (178,255 mg; 0,5 mmoles) em piridina (213  $\mu\text{l}$ ) e etanol 95 % (926,93  $\mu\text{l}$ ) e, de seguida, adicionou-se cerca de 60,6 mg de cloridrato de hidroxilamina. Esta solução foi deixada em refluxo durante sensivelmente 30 minutos. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 4 horas, tendo o substrato sido completamente consumido, observando-se uma mancha correspondente ao produto de reacção com Rf de 0,642.

Após o substrato estar completamente consumido, arrefeceu-se a solução em gelo durante algum tempo observando-se a formação de um precipitado branco. De seguida, recolheu-se, por filtração, o precipitado, que foi lavado posteriormente com água (30 ml) e que se transferiu para um recipiente seco e pesado. No dia seguinte pesou-se o recipiente com o sólido, que continha 150 mg do produto final desta reacção. O rendimento final do processo foi, portanto 80,749 %. O produto final desta reacção específica, foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:3), tendo-se obtido o composto **8** puro.

O produto bruto da reacção foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN.<sup>60</sup> IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3470, 3406, 2929, 1719, 1600, 1434, 1372, 1269, 1032;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) $\delta$ : 0.929 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 1.034 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 1.987 (3H, s, H<sub>3</sub>-21), 4.57-4.59 (1H, m, H-3), 5.36 (1H, d, H-6), 6,04 (1H, dd, H-16).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) $\delta$ : 170.81 (C-3), 140,35 (C-5), 122.47 (C-6), 151,78 (C-16), 154,31 (C-20).

#### 4.1.4.8 Síntese da pregnenolona **10**<sup>27,53,54</sup>

Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se o substrato **9** (179,255 mg; 0,5 mmole) em metanol (4,023 ml) à temperatura ambiente, com agitação magnética. De seguida, adicionou-se KOH 10 % (1,36 ml) em metanol. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:2) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 4 horas, observando-se uma mancha correspondente ao produto de reacção com um Rf

de 0,458 e também se observaram vestígios de matéria-prima inalterada. A mistura da reacção foi concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo e de seguida, ao pó resultante juntou-se diclorometano (75 ml) e água (10 ml), ficando esta mistura sob agitação magnética durante cerca de 2 horas. A fase aquosa foi novamente extraída com diclorometano (2 x 50 ml). Quanto à fase orgânica total foi lavada com água (10 ml), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura, obtendo-se o composto final pretendido **10** (104 mg; 65,72 %). Esta reacção seguiu o mesmo procedimento descrito na secção 7.1.4.1.

O produto bruto da reacção foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN.  $^{19}\text{IV}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3502, 2929, 1681, 1436, 1358, 1271, 1050;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) $\delta$ : 0.613 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 0,989 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 2.102 (3H, s, H<sub>3</sub>-21), 3.50 (1H, m, H-3), 5.33 (1H, d, H-6);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) $\delta$ : 71.72 (C-3), 140.77 (C-5), 121.2 (C-6), 209.55 (C-20).

#### 4.1.4.9 Síntese da oxima da pregnenolona acetato **11**<sup>60</sup>

A reacção seguiu o mesmo procedimento descrito na secção 4.1.4.7, mas neste caso partiu-se de 0,5 mmol (179,255 mg) de acetato de pregnenolona. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:1) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 4 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção de R<sub>f</sub> 0,9.

O rendimento final do processo foi de 71,752 % (134 mg do composto **11**).

O produto bruto da reacção foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN.  $^{19}\text{IV}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3264, 3009, 2936, 1730, 1366, 1247, 1037;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) $\delta$ : 0.622 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 0,995 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 2,006 (3H, s, H<sub>3</sub>-21), 4.56-4.60 (1H, m, H-3), 5.38 (1H, d, H-6),  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) $\delta$ : 74,08 (C-3), 139.87 (C-5), 122.59 (C-6), 56.82 (C-17), 159.164 (C-20).

#### 4.1.4.10 Síntese da oxima da Pregnenolona **12**<sup>60</sup>

A reacção seguiu o mesmo procedimento descrito na secção 4.1.4.7, mas neste caso partiu-se de 0,25 mmol (79,13 mg) de pregnenolona. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:3) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 4 horas, tendo o substrato sido completamente consumido, observando-se-se uma mancha correspondente ao produto de reacção com R<sub>f</sub> de 0,272. O rendimento final do processo foi de 49,814 % (41 mg do composto **12**).

O produto bruto da reacção foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN.  $^{19}\text{IV}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3458, 3243, 1664, 1434, 1371, 1236, 1047;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) $\delta$ : 0.628 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 0,991 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 1.84 (3H, s, H<sub>3</sub>-21), 3.49-3.51 (1H, m, H-3), 5.33 (1H, t, H-6).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) $\delta$ : 71.95 (3-C), 140.99 (5-C), 121.7 (6-C), 56.386 (C-17), 206,653 (C-20).

#### 4.1.4.11 Diacetato de 20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -di-ilo **13**<sup>55</sup>

A reacção seguiu o mesmo procedimento descrito na secção 4.1.4.4, mas neste caso partiu-se de 1 mmol (240,88 mg) de substrato. O controlo de reacção por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo - metanol 1:1:0,5) mostrou que a reacção estava completa ao fim de 5 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Obteve-se uma mancha principal correspondente ao produto da reacção com R<sub>f</sub> de 0,875, e várias manchas de menor intensidade relativas a produtos secundários. O rendimento bruto do processo de síntese foi de 66 % (199 mg). O produto final desta reacção específica foi submetido a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:3) tendo-se obtido o composto **13** puro.

O produto bruto da reacção foi analisado por IV, <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN.<sup>61</sup> IV (cm<sup>-1</sup>): 3080, 2982, 2937, 2924, 2860, 1729, 1698, 1372, 1230; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 0,638 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 0,99 (3-H, s, H<sub>3</sub>-19), 2,003 (3H, s, H<sub>3</sub>-21), 4,58 (1H, m, H-3), 5,34 (1H, m, H-6), 5,463 (1H, t, H-16); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$ : 170,747 (C-3), 139,911 (C-5), 122,233 (C-6), 170,967 (C-16), 206,691 (C-20).

## **4.2 Avaliação biológica**

### **4.2.1 Material**

#### **4.2.1.1 Reagentes**

- Meio de cultura RPMI 1640, Sigma Aldrich (Portugal)
- HEPES, Sigma Aldrich (Portugal)
- L-Glutamina, Sigma Aldrich (Portugal)
- Piruvato de sódio, Sigma Aldrich (Portugal)
- Soro bovino fetal (FBS), Biochrom AG (Portugal)
- Antibiótico AB (Solução de estreptomicina e penicilina e anfotericina-B)
- Antibiótico SP (Solução de estreptomicina e penicilina)
- Meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Sigma Aldrich (Portugal)
- 0,025 % Tripsina em PBS/EDTA (1g tripsina para 666mL de PBS/EDTA)
- Azul triptano, Merck (Alemanha)
- DMSO- Dimetilsulfóxido, Sigma Aldrich (Portugal)
- MTT, Sigma Aldrich (Portugal)
- Água MilliQ - Millipore
- Tampão fosfato salino - PBS (90% de água MilliQ e 10% de PBS 10x)
- Tampão glicina Sorensen (solução de 0,1M glicina, 0,1M NaCl com pH ajustado a 10,5 com 0,1M NaOH)

#### **4.2.1.2 Instrumentação**

- Leitor espectofotométrico de microplacas, Anthos 2020
- Microscópio Olympus CKX 41
- Incubadora- Bioblock Scientific- Sigma Aldrich
- Centrífuga Nuaire <sup>TM</sup>, DHD Autoflow

#### 4.2.2 Tipos de células usadas neste estudo e sua cultura

Para realizar este estudo, foram utilizados três tipos distintos de células: fibroblastos da derme humana não cancerígenos (NHDF), células epiteliais humanas de cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7) e células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP).

As células NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblasts*) são fibroblastos saudáveis derivados da derme humana. No estudo efectuado, estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (*RoswellPark Memorial Institute* - Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Biochrom AG, Portugal), 20mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, Portugal), 10mM de HEPES (Sigma Aldrich, Portugal), 1mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich, Portugal) e 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B), a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 2 a 3 dias e as células eram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência foi alcançada. Nas experiências, as células foram utilizadas na passagem 9.

As células MCF-7 são uma linha celular de células epiteliais, isoladas a partir de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos que apresentava cancro da mama metastático. MCF-7 é o acrónimo de *Michigan Cancer Foundation-7*, referindo-se ao Instituto onde pela primeira vez estas células foram isoladas. Esta linha celular deriva de um adenocarcinoma mamário. As células possuem características aderentes, crescimento em monocamada e apresentam receptores de estrogénios (Levenson A. S., et al, 1997). As células MCF-7 foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de FBS (Biochrom AG, Portugal) e com 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B), a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 2 a 3 dias e as células eram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência foi alcançada. Nas experiências, as células foram utilizadas nas passagens 15 a 17.

As células LNCaP (*Lymph node carcinoma of the prostate*) são uma linha celular de células humanas do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios, isoladas em 1977, a partir de uma metástase de um nódulo linfático supraclavicular de um homem caucasiano com 50 anos. São células epiteliais aderentes que podem crescer sob a forma de agregados ou células isoladas. (Horoszewicz, J. S., et al, 1983) As células LNCaP foram mantidas em meio RPMI (Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de FBS (Biochrom AG, Portugal) e com 1% de antibiótico (10,000 unidades/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina), a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 3 dias e as células eram divididas para novos frascos de cultura quando a confluência foi alcançada. Nas experiências, as células foram utilizadas na passagem 17.

### 4.2.3 Técnicas de cultura celular utilizadas

#### 4.2.3.1 Tripsinização

Ao longo do tempo, as culturas de células foram ficando confluentes nos frascos. Após atingirem 70 a 80% de confluência, as células foram expandidas para mais frascos de cultura. Para tal foi realizado o procedimento da tripsinização. Este procedimento consistiu na aspiração com vácuo do meio de cultura existente no interior do frasco. De seguida, fez-se lavagem das células com tampão fosfato salino (PBS) (cerca de 10mL para um frasco de 75mL) e colocaram-se cerca de 10mL (no caso de um frasco de 75mL) de tripsina (0,025% em PBS/EDTA - Sigma Aldrich, Portugal); em contacto com as células. Colocou-se o frasco de cultura na estufa (Bioblock Scientific - Sigma Aldrich, Portugal) durante 5 minutos a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, para que as células existentes no suporte sólido (base do frasco de cultura) se soltem e se dissociem entre si. Após confirmação microscópica de que as células se encontravam em suspensão, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura suplementado com FBS previamente aquecido a 37°C e a suspensão celular resultante foi centrifugada a 1000 rpm durante 8 minutos. Seguidamente, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com meio de cultura. A suspensão celular resultante foi colocada em novos frascos de cultura.

#### 4.2.3.2 Contagem de células

Para iniciar um novo ensaio celular foi necessário contabilizar o número de células a colocar nos pocetos. Para tal, após tripsinização das culturas celulares, o *pellet* resultante foi ressuspendido em 1ml de meio de cultura completo. Seguidamente, retiraram-se 10µl da suspensão celular para o interior de um tubo *ependorf* e ao mesmo adicionaram-se 10µl de solução de azul de triptano 0,4% (Merck, Alemanha). O conteúdo resultante foi aplicado numa câmara de *Neubauer* e contabilizou-se o número de células existente por quadrante. Para calcular o volume a retirar da suspensão celular, calculou-se a média de células existente por quadrante e multiplicou-se o valor obtido por 2 (devido à diluição das células no corante azul de triptano).

Com o valor resultante calculou-se a quantidade a retirar da suspensão celular inicial para obter a concentração de células pretendida nos pocetos.

#### 4.2.3.3 Procedimento geral realizado para avaliar o efeito dos compostos estudados na viabilidade celular

Para cada ensaio celular, foram preparadas placas *multiwells* de 24 ou 48 pocetos, onde foi colocado um volume adequado de suspensão celular com uma concentração de  $2 \times 10^4$  células/mL, sendo mantidas em meio de cultura adequado por aproximadamente 48 horas. Passado o período de tempo pretendido, adicionaram-se os compostos em estudo nas concentrações requeridas.

A preparação das soluções dos compostos a estudar consistiu na dissolução dos mesmos em 2ml de etanol absoluto, de modo a obter uma concentração final de  $10^{-2}$ M. A partir desta solução foram preparadas seis concentrações diferentes de cada composto: 0,01 $\mu$ M; 0,1 $\mu$ M; 1 $\mu$ M; 10 $\mu$ M; 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M, em meio de cultura adequado para cada tipo de células. Os compostos permaneceram em contacto com as células durante 48 horas. Em todas as experiências realizadas, a concentração final de solvente nos pocetos foi sempre inferior a 1%; esta concentração de solventes não teve efeito na viabilidade celular.

Passado o período de exposição das células aos compostos, as placas foram imediatamente sujeitas ao ensaio de viabilidade/proliferação celular a seguir descrito (ensaio MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Para todas as concentrações dos compostos de interesse testadas, foram realizados ensaios em triplicado de modo a efectuar uma análise estatística. Por outro lado, em cada placa *multiwell* foi testado um controlo. Este consistiu em aplicar apenas meio de cultura sem adicionar qualquer composto de interesse. A média dos valores de absorvância obtida nos três pocetos do ensaio controlo foi considerada como 100% de viabilidade celular. Todos os restantes valores adquiridos após a incubação com os compostos de interesse foram considerados em relação ao ensaio controlo, de forma a uniformizar os resultados obtidos e comparar as viabilidades celulares na ausência dos compostos testados com a presença dos mesmos.

#### 4.2.3.4 Ensaio para analisar a viabilidade celular - MTT

O ensaio de toxicidade depende do número de células presentes, bem como da actividade mitocondrial celular e baseia-se na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazano (composto azul, insolúvel em meio aquoso) pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, existente no interior das células viáveis. A quantidade de formazano produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes e que apresentam uma respiração celular activa.<sup>62</sup>

Após as linhas celulares terem estado em contacto com os diferentes compostos durante o período de tempo do ensaio, os sobrenadantes foram aspirados e aplicou-se uma



solução de MTT (com uma concentração de 0,5 mg/mL em tampão fosfato salino - PBS) em contacto com as células, durante 4 horas, numa atmosfera de 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e na ausência de luz. Após 4 horas de exposição à solução de MTT, aspirou-se o conteúdo existente na placa de *microwells* e foi colocado, em cada poceto, DMSO e tampão glicina Sorensen. O DMSO permitiu a lise celular e solubilização dos cristais de formazano e o tampão glicina permitiu estabilizar a cor obtida. Posteriormente, o conteúdo de cada poceto foi transferido para uma microplaca de 96 *wells* que foi introduzida no leitor espectofotométrico de microplacas e foi quantificada a absorvância a 570 nm. A extensão de morte celular foi expressa como percentagem de viabilidade celular em comparação com as células controlo.

### 4.3 Análise estatística

Para comparar os resultados obtidos, recorreu-se a uma análise estatística. Os resultados gráficos de citotoxicidade foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre múltiplos grupos foi analisada pelo teste *t-student* para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. A diferença entre grupos foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados a partir da curva dose-resposta por cálculos de ajustamento sigmóide.

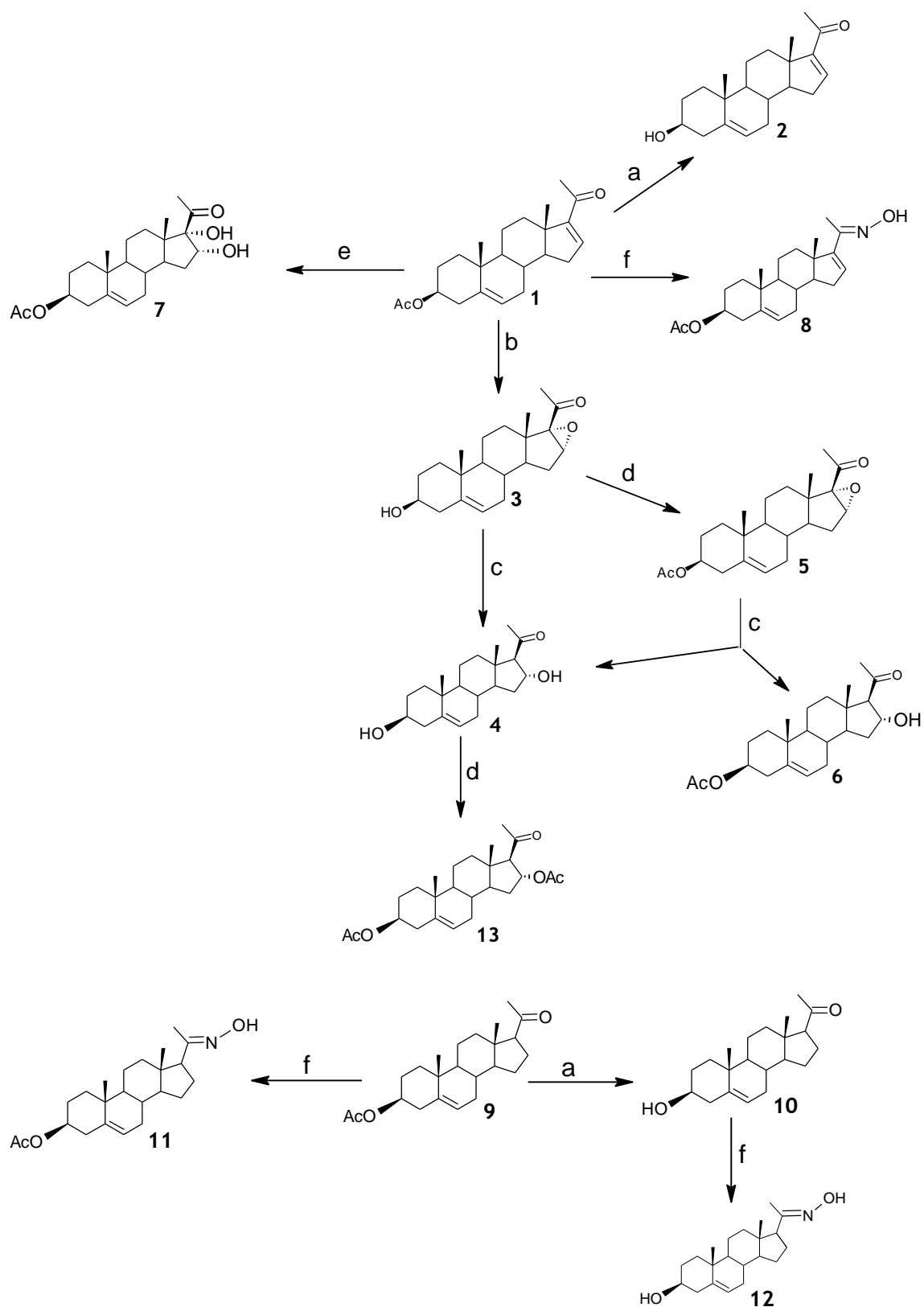


## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Estratégia de síntese

De acordo com os aspectos de relação estrutura-actividade previamente estudados, foi planeada a síntese de compostos de núcleo pregnano com a dupla ligação em C5, contendo ou não a dupla ligação em C16, funcionalizando selectivamente o anel D e preparando oximas em C20. Adicionalmente o efeito da presença de grupo 3 $\beta$ -OH ou 3 $\beta$ -OAc será também considerado. Após serem caracterizados, estes compostos serão avaliados em linhas de células cancerígenas da mama e próstata humanas e em células não cancerígenas (NHDF).

A estratégia de síntese foi delineada envolvendo sucessivas etapas (esquema 1). A primeira consistiu na hidrólise do grupo acetato na posição 3 $\beta$  do núcleo esteróide do substrato **1**, obtendo-se o derivado 3 $\beta$ -hidroxilado. De seguida, epoxidou-se, em meio alcalino, selectivamente, a olefina 16,17 do mesmo substrato **1**, formando-se o respectivo epóxido 3 $\beta$ -hidroxilado **3**. A etapa seguinte consistiu na abertura redutiva deste epóxido **3**, formando-se o álcool **4**. Posteriormente, acetilou-se o álcool **4**, com anidrido acético/DMAP, obtendo-se posteriormente o composto diacetilado **13**. A acetilação do substrato **3** usando esta mesma estratégia permitiu obter o epóxido **5** 3 $\beta$ -acetilado. De seguida, redutivamente procedeu-se à abertura do epóxido **5**. Adicionalmente, usando permanganato de potássio a 0 °C em acetona, conseguiu-se di-hidroxilar, selectivamente a olefina 16,17 a partir do alceno **1**, obtendo-se o composto **7**. Finalmente, a partir dos substratos **1**, **9** e **10**, usando cloridrato de hidroxilamina procedeu-se à síntese das oximas **8**, **11** e **12**, respectivamente.



**Esquema 1.** Representação da estratégia de síntese de compostos pregnano esteróides delineada para o presente trabalho. Reagentes e condições: (a) KOH, MeOH, H<sub>2</sub>O, 30 °C, 2 h; (b) MeOH, NaOH 4N, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, 4 °C, 18 h; (c) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O, EtOH, 50 °C, 2h; (d) Ac<sub>2</sub>O, THF, DMAP, t.a., 3h; (e) KMnO<sub>4</sub>, AcOH, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>O, 0 °C, 5 minutos; (f) Pyr, EtOH 95%, NH<sub>2</sub>OH·HCl, refluxo, 4h;

### 5.1.1 Hidrólise alcalina

Esta reacção é considerada uma substituição nucleofílica acílica, em que, em solução básica de KOH, o ião  $\text{OH}^-$ , com denotada nucleofilicidade, ataca o carbono carbonílico constituinte do grupo 3 $\beta$ -acetilo, originando-se um intermediário tetraédrico que se decompõe de forma a formar os derivados 3 $\beta$ -hidroxilados, de acordo com este mecanismo já extensamente conhecido (Figura 13). Em alternativa, esta reacção de hidrólise poderia ter sido realizada em condições acídicas.<sup>27</sup>

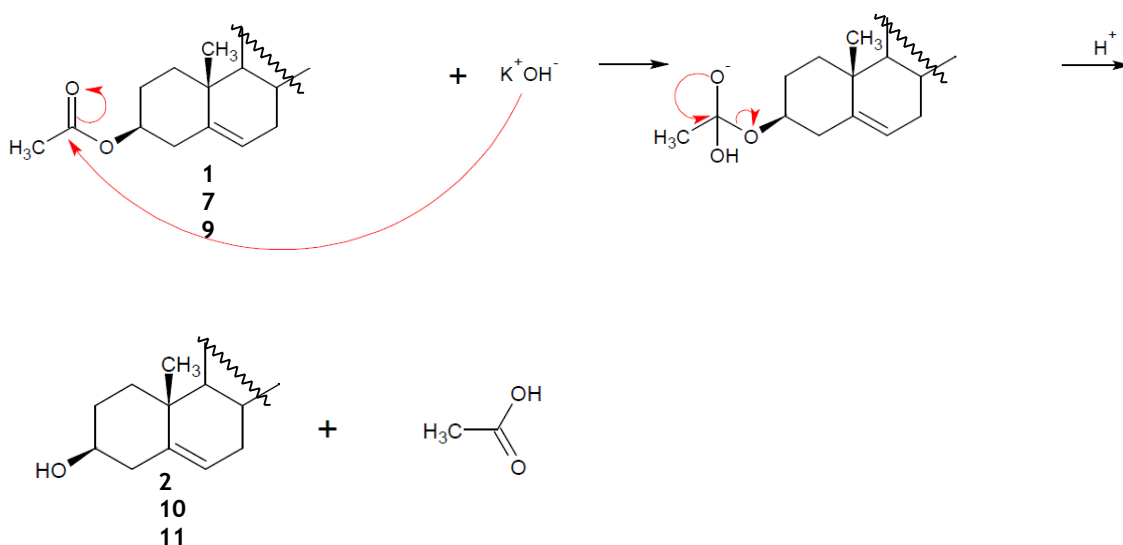


Figura 13. Mecanismo da reacção de hidrólise dos derivados pregnano 1e 9.

Esta reacção foi aplicada aos compostos 1e 9, pretendendo obter-se os compostos finais 2, 10 (Esquema 1).

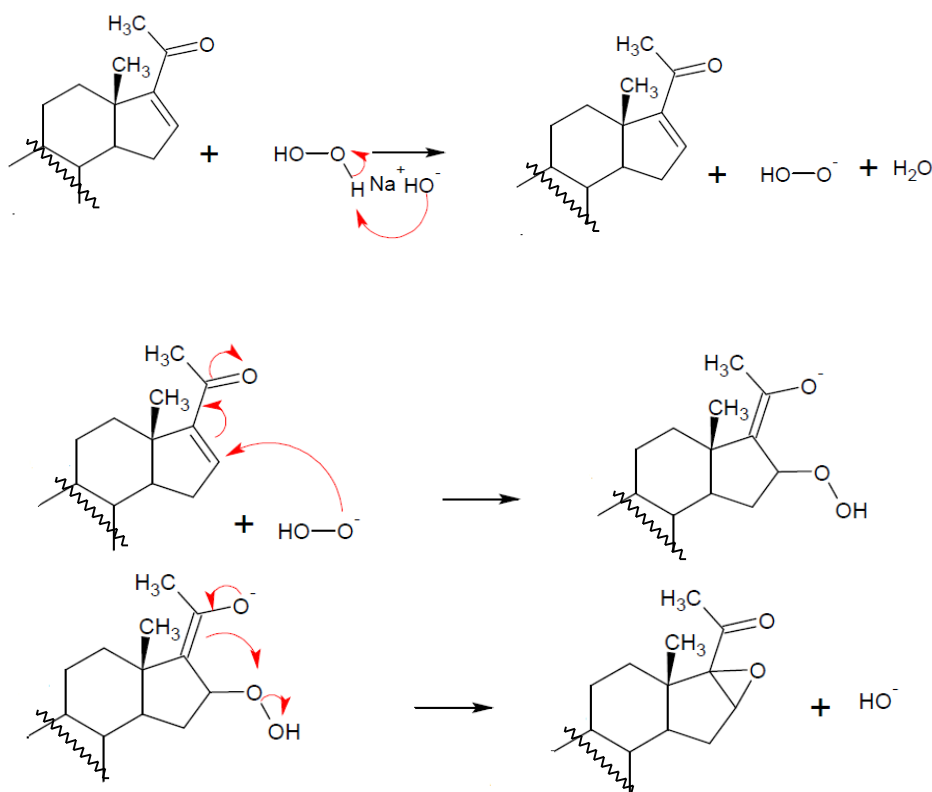
### 5.1.2 Epoxidação $\alpha$ -selectiva de $\Delta^{16}$ -esteróides pelo $\text{H}_2\text{O}_2$

A epoxidação de olefinas consiste na adição de um átomo de oxigénio que se liga aos dois carbonos de uma dupla ligação, formando um anel oxaciclopropano.<sup>33,63</sup> A introdução de oxigénio à ligação dupla neste tipo de reacção trata-se de uma adição *syn*.

A formação de epóxidos é de extrema importância em química orgânica uma vez que os epóxidos são intermediários-chave para a preparação de um largo número de grupos funcionais, por exemplo através de reacções de abertura do anel epóxido.<sup>33,35,57</sup> O elevado grau de estereo-selectividade associada à maioria das sínteses e reacções de epóxidos evidencia a enorme utilidade sintética destes compostos.<sup>30</sup> Adicionalmente, a função epóxido também está presente em diversos compostos com actividades biológicas importantes.<sup>33,47</sup>

Em geral, ocorre a formação de  $\alpha$ -epóxidos em esteróides com fusão dos anéis *trans-anti-trans*. Devido ao impedimento estereoquímico imposto pelos grupos metilo angulares em

C-10 e C-13, que protegem a face  $\beta$ , o ataque preferencial por parte do reagente dar-se-à na face  $\alpha$  do esqueleto do esteroide.<sup>64</sup> O método mais largamente utilizado para a síntese de epóxidos é a reacção de um alceno com um peroxiácido.<sup>63</sup> Contudo, a utilização deste reagente iria certamente epoxidar a dupla ligação em C5. Assim, no sentido de favorecer a régio-selectividade para a dupla ligação em C16 recorreu-se, contudo, a uma estratégia diferente - utilizando peróxido de hidrogénio em meio alcalino. O mecanismo representativo desta reacção está apresentado na figura 14.



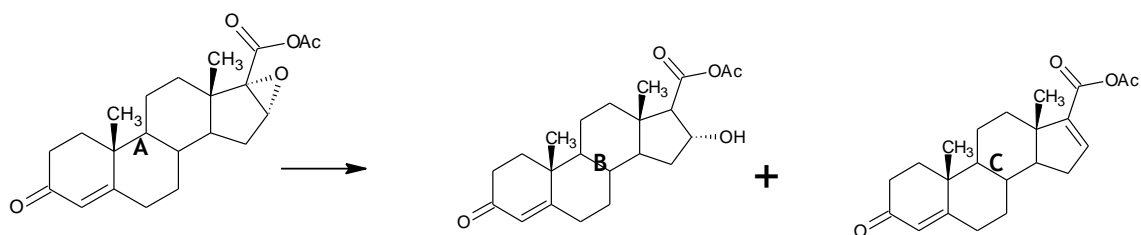
**Figura 14.** Mecanismo da reacção de epoxidação do derivado pregnano 1.

Dadas as condições alcalinas nesta reacção, não surpreende que também ocorra a hidrólise alcalina do éster em C3.

### 5.1.3 Abertura redutiva de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epóxi-20-cetonas usando hidrato de hidrazina

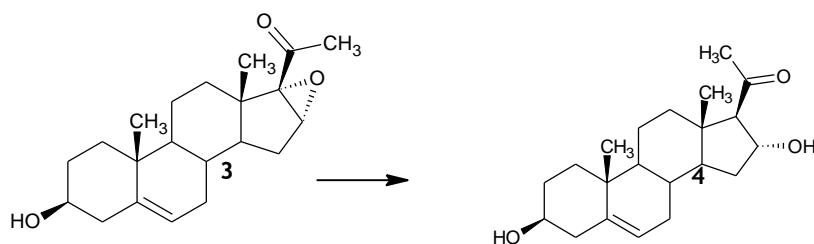
A redução selectiva de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxicetonas é reconhecida como um processo sinteticamente importante na construção de uma variedade de produtos naturais, através destes intermediários aldol.<sup>36,57</sup> Vários métodos e reagentes têm sido relatados na literatura

para efectuar esta reacção.<sup>36,57</sup> O uso de sais de crómio realizado por Cole e Julian, 1954, foi o primeiro método geral usado para a conversão de epóxi-cetonas no anel D (Figura 3, A) em  $\beta$ -hidroxi-cetonas correspondentes.<sup>57</sup> Os produtos formados dependem, contudo, do tipo de sal de crómio usado na reacção. Usando, por exemplo, diacetato de crómio, aumenta-se o rendimento da  $\beta$ -hidroxi cetona (figura 15, B). Contudo, ao usar-se  $\text{CrCl}_2$  formar-se-á uma cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (figura 15, C).<sup>57</sup>



**Figura 15.** Redução selectiva de  $\alpha,\beta$  cetonas a  $\beta$ -cetonas usando sais de crómio.

A clivagem redutiva de epóxi-cetonas no anel D no núcleo esteróide também pode ser realizada usando lítio (metal alcalino) em amónia líquida na presença de cloreto de amónio (fonte de protões).<sup>36,57</sup> Usando amálgama de alumínio também se consegue reduzir epóxi-cetonas nas correspondentes  $\beta$ -hidroxi-cetonas (Greene, 1982).<sup>36,57</sup> Contudo, existem muitos inconvenientes no uso deste tipo de reagentes na clivagem redutiva de  $\alpha,\beta$ -epóxi-cetonas, tais como, a necessidade do uso de condições drásticas, rendimentos baixos, baixa selectividade, e a necessidade de uso de quantidades estequiométricas de reagentes tóxicos.<sup>57</sup> Neste contexto, Salvador (2005) descreveu um procedimento mais eficiente e versátil para a clivagem redutiva de  $\alpha,\beta$ -epóxi-cetonas a correspondentes  $\beta$ -hidroxi-cetonas, sob condições suaves, usando hidrato de hidrazina em etanol (figura 16),<sup>57</sup> tendo sido este o processo por nós utilizado para efectuar a abertura redutiva das epoxicetonas 3 e 5 (Esquema 1).



**Figura 16.** Redução selectiva de  $\alpha,\beta$  cetonas a  $\beta$ -cetonas usando hidrato de hidrazina em etanol.

O plausível mecanismo desta reacção de clivagem redutiva de cetonas  $\alpha,\beta$ -epóxi está representado na figura 17.

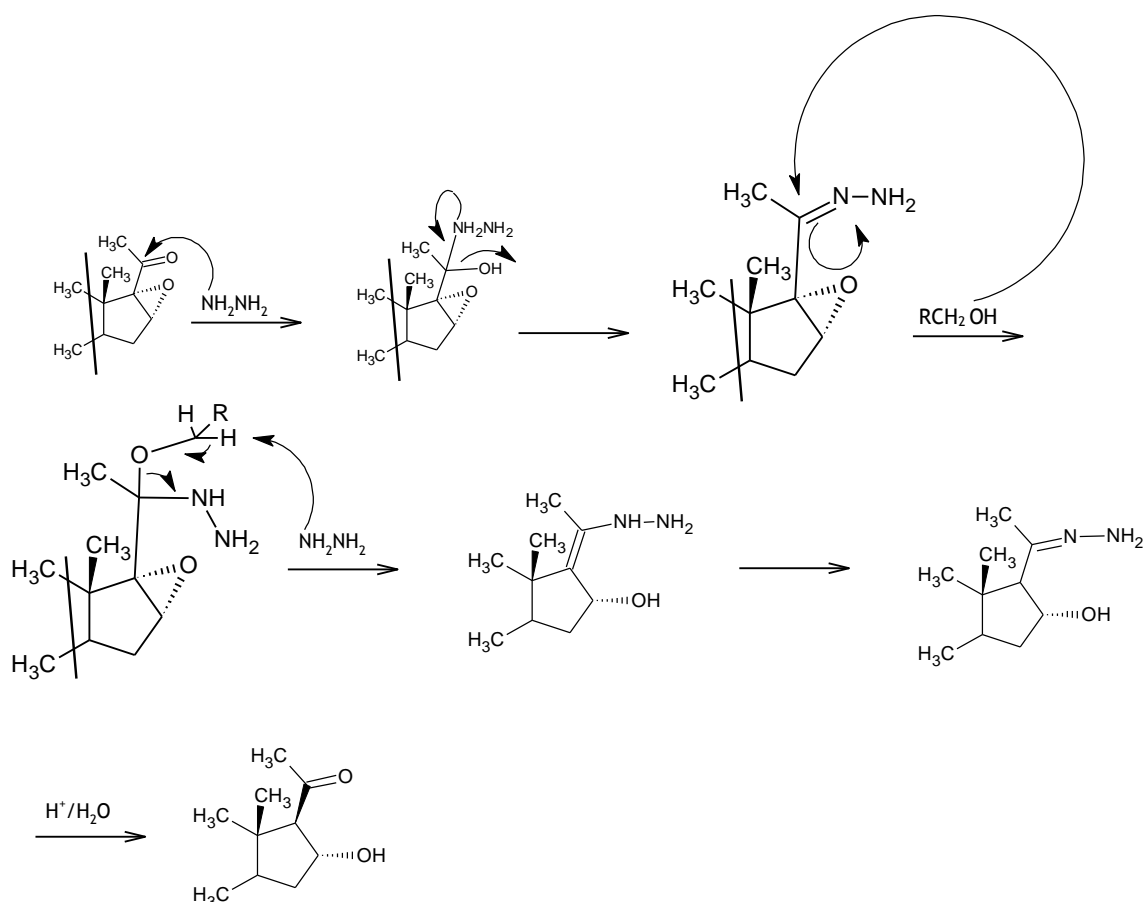


Figura 17. Mecanismo da reacção de redução selectiva de  $\alpha,\beta$ -epoxi cetonas.

#### 5.1.4 Acetilação

A reacção de acetilação é a adição de um grupo acilo, por exemplo a álcoois ou aminas, com formação de derivados acilados. Foram desenvolvidos, nas últimas décadas, métodos sintéticos de obtenção de ésteres a partir de condensações catalíticas entre quantidades equimolares de ácidos carboxílicos e álcoois. No entanto, estes métodos não são os ideais, por exemplo, na esterificação de álcoois terciários, fenóis pouco nucleofílicos, álcoois alílicos ácido-sensíveis, amino-álcoois e álcoois com baixa solubilidade em solventes menos polares.<sup>65</sup> Portanto, alternativas mais eficientes ainda estão a ser estudadas.<sup>65</sup>

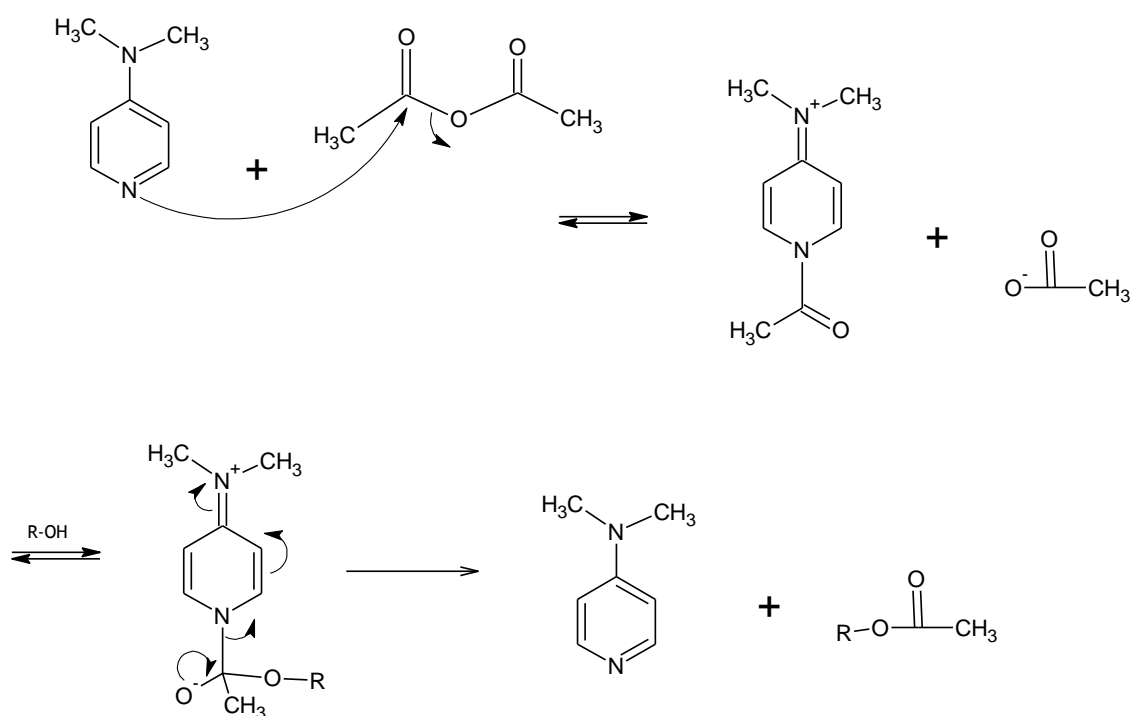
Em 1969, Steglich and Höfle reportaram que o DMAP é um catalisador de acilação muito eficaz. De forma independente, o grupo russo de Litvinenko e Kirichenko também descobriram que substituindo a piridina por DMAP se acelerava a reacção de acilação.<sup>66</sup> Como resultado de diversas observações, o DMAP tem sido um catalisador usado sobretudo em reacções de acilação mais difíceis permitindo também obter elevadas regio- e estereoselectividades.<sup>67</sup> O DMAP tem sido utilizado numa ampla gama de aplicações tais como,



acilação de álcoois, aminas, fenóis e enolatos, em particular a acilação álcoois secundários ou terciários estericamente impedidos.<sup>65</sup>

Sakakura, A., K. Kawajiri, et al. (2007) reportaram que a combinação de DMAP com anidrido acético é vantajoso na acilação de álcoois menos reactivos, uma vez que a reactividade do anidrido acético é muito maior do que os ácidos carboxílicos.<sup>65</sup> Uma das primeiras reacções descritas de acilação catalisada pelo DMAP é a acetilação de 1-metilciclohexanol, um álcool estericamente impedido.<sup>67</sup> Neste exemplo específico, o 1-metilciclohexanol não é acetilado sob condições básicas (piridina,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ), porém na presença de 4,2 mol% de DMAP obtém-se um óptimo rendimento (86%) após 14 horas à temperatura ambiente.<sup>66,67</sup> A eficiência catalítica deste catalisador deve-se, provavelmente, à estabilização do ião acilo-piridina, que desempenha um papel de extrema relevância no ciclo catalítico.<sup>66</sup> Contudo, é vital perceber que tanto os efeitos estéricos, como as propriedades nucleofílicas do DMAP, adicionalmente, afectam a reactividade deste catalisador.<sup>66</sup> Por fim, é de realçar que o DMAP não serve apenas como catalisador das reacções de acilação e transesterificações, mas também para várias transformações orgânicas como a protecção de aminas, C-acilações, aplicações na química de produtos naturais, entre outras.<sup>66</sup>

O mecanismo específico da reacção de acetilação está representado na figura 18.



**Figura 18.** Mecanismo da reacção de acetilação usando o catalisador 4-dimetilamino-piridina (DMAP).

Esta reacção foi aplicada aos compostos **3**, e **4**, pretendendo obter-se os compostos **5** e **13** (Esquema 1).

### 5.1.5 Dihidroxilação $\alpha$ -selectiva de $\Delta^{16}$ -esteróides usando $\text{KMnO}_4$

De um modo geral, os alcenos são um ponto de entrada para “virtualmente” todos os outros grupos funcionais que se tem estudado. Por essa razão e considerando que muitas dessas reacções nos fornecem algum grau de controlo sobre a regio-selectividade e/ou sobre a estereoquímica dos produtos, os alcenos são intermediários versáteis para a síntese.<sup>63</sup>

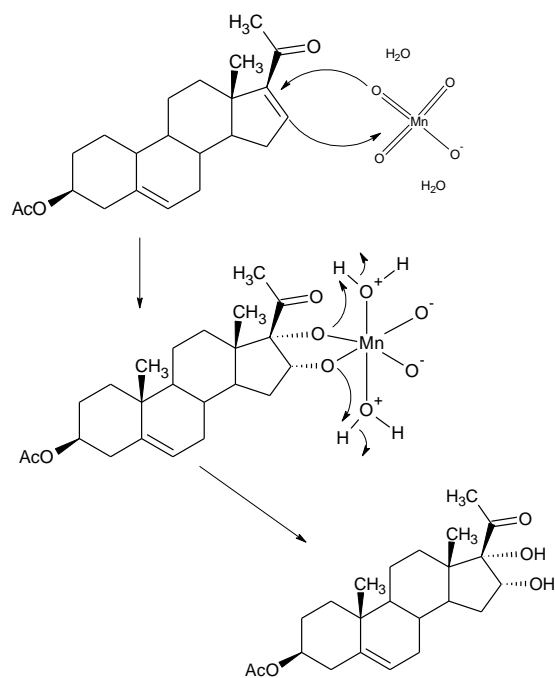
Os alcenos sofrem um vasto número de reacções nas quais a ligação dupla carbono-carbono é oxidada. Uma reacção importante, neste contexto, é a di-hidroxilação de alcenos.<sup>63</sup> O tetróxido de ósmio, por exemplo, é largamente utilizado para sintetizar *cis*-dióis. O permanganato de potássio também pode ser utilizado, mas a frio, diluído, sob condições básicas. A quente, o  $\text{KMnO}_4$ , apesar de ser um oxidante forte, é propenso a quebrar o diol através de oxidações adicionais.<sup>63</sup>

Os mecanismos para a formação de *cis*-dióis através de tetróxido de ósmio e de permanganato de potássio, envolvem intermediários cíclicos que resultam na adição *sin* dos átomos de oxigénio. Após a formação do intermediário cíclico com ósmio ou manganésio, ocorre a quebra nas ligações oxigénio-metal sem alterar a estereoquímica das novas ligações C-O.<sup>63</sup>

A estereoquímica *sin* destas di-hidroxilações pode rapidamente ser observada pela reacção do ciclopent-1-eno com tetróxido de ósmio ou permanganato de potássio. O produto em ambos os casos é o *cis*-1,2-ciclopentanodiol.<sup>63</sup>

Dos dois reagentes mencionados para a di-hidroxilação *sin*, o tetróxido de ósmio é o mais largamente aplicado na síntese orgânica. Contudo, o tetróxido de ósmio é altamente tóxico, volátil e muito caro. Por essas razões, surgem na literatura métodos alternativos que permitam que a di-hidroxilação de alcenos seja mais prática, menos dispendiosa e que ocorra com um elevado rendimento.<sup>63</sup> Cooley, G., B. Ellis, et al. (1955) exploraram várias vias de hidroxilação de pregn-16-en-20-onas, usando permanganato de potássio ou ácido ósmico.<sup>68</sup>

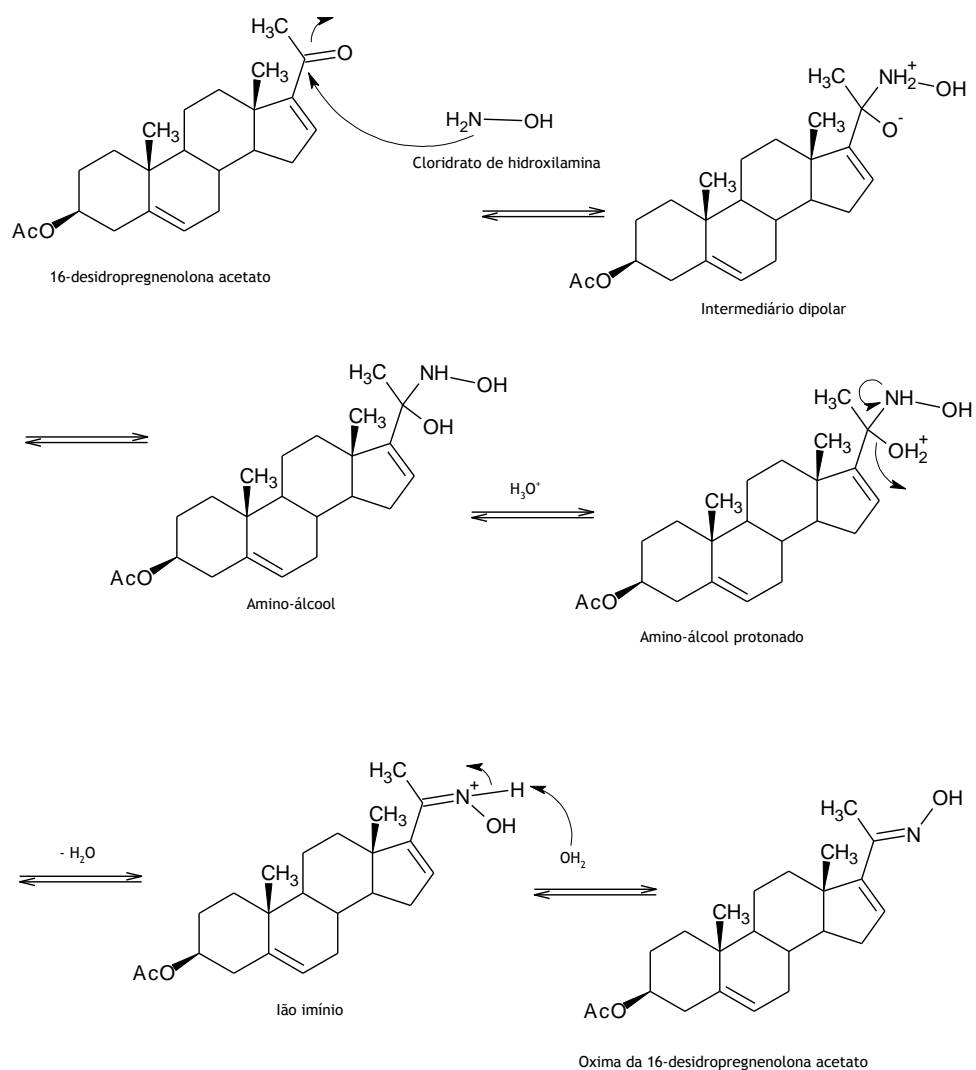
A oxidação da 16-DHP Ac. com permanganato de potássio a 0°C em acetona, contendo uma quantidade limitada de ácido acético, permite a obtenção do 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -di-hidroxi-20-oxopregn-5-en-3 $\beta$ -il acetato **7**, que já não tem absorção ultravioleta (254 nm), ao contrário do 16-DHP Ac..<sup>68</sup> Shull, B. K. and M. Koreeda (1990) também reportam que usando permanganato de potássio se consegue converter, selectivamente, pregn-16-en-20-onas em 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$  dióis.<sup>59</sup> O mecanismo plausível desta reacção está representado na figura 19.



**Figura 19.** Mecanismo reaccional da dihidroxilação  $\alpha$ -selectiva de  $\Delta^{16}$ -esteróides usando  $\text{KMnO}_4$ .

### 5.1.6 Síntese de 20-C oximas

As oximas são uma classe de compostos orgânicos que resultam da reacção da hidroxilamina,  $\text{NH}_2\text{OH}$ , com uma cetona, por meio de um mecanismo que se encontra representado na figura 20.



**Figura 20.** Representação do mecanismo reaccional da formação de oximas.

Esta reacção foi aplicada aos compostos **1**, **9** e **4**, pretendendo obter-se os compostos **8**, **12** e **13** (Esquema 1).

## 5.2 Aplicação da estratégia de síntese

A síntese dos derivados pregnano foi iniciada pela reacção de hidrólise alcalina com o acetato de 16-desidropregnenolona **1**, usando KOH em metanol, para obter o composto **2**. tendo-se obtido uma mistura de compostos, no qual se observou, para além do composto **2**, um produto secundário mais relevante, bem como vestígios de outro produto secundário e de matéria-prima inalterada (figura 21). Provavelmente, e de acordo com a literatura, o produto secundário maioritário que se forma aquando do tratamento do acetato de 16-desidropregnenolona com uma solução de hidróxido de sódio metanólica é o derivado 3 $\beta$ -hidroxi,16-metoxi.<sup>61</sup> Esta mistura, portanto, foi submetida a cromatografia em coluna flash (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:4) de forma a obter-se o composto hidroxilado **1** puro.

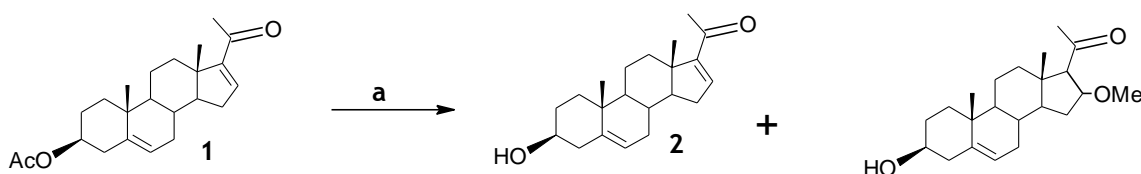


Figura 21. Reacção de hidrólise do composto **1**. (a) KOH, MeOH, 30°C, 2h.

A etapa de síntese que se seguiu foi a epoxidação do composto **1**. A epoxidação de olefinas com perácidos é usualmente realizada em solventes apróticos de baixa polaridade, como diclorometano, clorofórmio, benzeno, *etc.* Mais recentemente, usou-se peróxido de hidrogénio em metanol e em meio alcalino na epoxidação de olefinas, e concluiu-se que se obtinham excelentes rendimentos reaccionais.<sup>62</sup> Outros tipos de perácidos, como o ácido benzenosselenínico, que é gerado *in situ* pela reacção entre o ácido benzenosselénico com peróxido de hidrogénio e apresenta rendimentos entre 35-85% na epoxidação deste tipo de olefinas, também têm sido utilizados.<sup>62</sup>

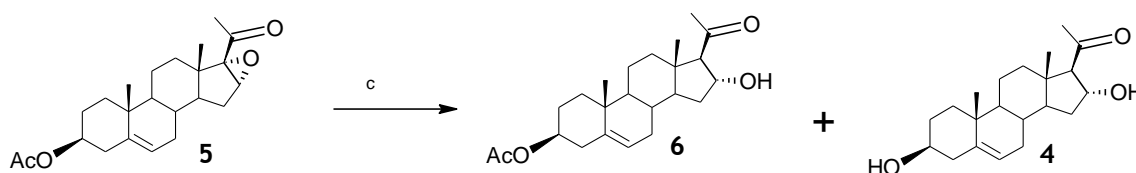
Os peroxiácidos actuam preferencialmente nas olefina-5,6 de  $\Delta^{5,16}$ -esteróides devido à maior densidade electrónica aqui existente. Contudo, usando o peróxido de hidrogénio em meio alcalino, ocorre a epoxidação, selectivamente, na olefina 16,17 conjugada, formando-se o composto **3**.<sup>25,31</sup> O processo teve um óptimo rendimento, 96,336 %, obtendo-se no final o epóxido **3** puro.

De acordo com a experiência relatada por Salvador (2005), efectuou-se a clivagem redutiva da cetona  $\alpha,\beta$ -epóxido **3**, sob condições suaves, usando hidrato de hidrazina, obtendo-se a correspondente  $\beta$ -hidroxi-cetona **4**. A temperatura apresenta um importante papel neste processo. Por exemplo, as reacções realizadas a temperaturas baixas (-20 °C, 0 °C) dão origem a cetonas  $\beta$ -hidroxiladas como único produto. Contudo, em reacções realizadas em similares condições porém, à temperatura ambiente e a 50 °C geralmente já se forma uma mistura de produtos  $\beta$ -hidroxilo/álcool alílico. Contudo, na abertura redutiva do

epóxido **3**, realizada a 50°C, nas condições descritas, obteve-se unicamente a cetona  $\beta$ -hidroxilada **4**. A presença de água não aparenta ter alguma influência sobre esta reacção, e usa-se um solvente comum (etanol) neste processo. Para o derivado pregnano **3**, o grupo 20-cetona na cadeia lateral flexível em C-17 permite realizar a reacção a 50 °C, levando à formação da correspondente  $\beta$ -hidroxi-cetona **4**. Este processo teve um rendimento razoável de 76 %. Contudo, para além da obtenção do álcool **4**, verificou, por TLC, a presença de alguns vestígios de matéria-prima inalterada. Esta mistura foi também submetida a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:4) tendo-se obtido o composto **4** puro (figura 15).

A acetilação dos grupos 3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -hidroxilos do composto **4**, foi conseguida através do uso de anidrido acético e DMAP, obtendo-se o composto diacetilado **13**. Obteve-se uma mancha correspondente ao produto de reacção e várias manchas relativas a produto secundário. Sabe-se da literatura que na acetilação do diol **4** usando anidrido acético e piridina se forma o pretendido composto diacetilado **13**.<sup>63</sup> O rendimento de crude desta reacção de acetilação por nós efectuado foi de 65,97 %. A mistura final obtida foi submetida a cromatografia *flash* (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 1:3), tendo-se obtido o composto **13** puro.

Ainda no contexto da clivagem redutiva de cetona  $\alpha,\beta$ -epoxidadas, protegeu-se a posição 3 $\beta$ -esteróide através da acetilação do epóxido **3**, e, de seguida, efectuou-se a abertura redutiva do anel oxirano. Estas duas reacções seguiram as mesmas condições anteriormente descritas. Nesta clivagem redutiva, obteve-se, contudo, uma mistura dos compostos **4** e **6** (figura 22). Por sua vez, de forma a obter-se os produtos puros teve de se submeter esta mistura a uma coluna cromatográfica, com um eluente: acetato de etilo - éter de petróleo numa proporção de 1:1. No fim do processo, obtiveram-se os compostos **4** e **6** numa proporção de 1:2. Este resultado fornece um dado interessante no que toca à reactividade do hidrato de hidrazina, solvente da reacção de abertura redutiva de epóxidos. Como se pode verificar, o grupo 3 $\beta$ -acetato é parcialmente hidrolisado neste processo ou devido às características básicas da hidrazina hidrato ou até na fase de acidificação após a reacção.



**Figura 22.** Clivagem redutiva do epóxido **5**, usando hidrato de hidrazina.

De forma a explorar uma outra via de hidroxilação de pregn-16-en-20-onas, conseguiu-se di-hidroxilar, selectivamente, o substrato **1** originando o diol correspondente **7**,

usando permanganato de potássio a 0°C em acetona. O processo de dihidroxilação teve um excelente rendimento 93, 207 %. Por último, procedeu-se à síntese das oximas **8** (80,749 %), **11** (71,752 %) e **12** (49,814%) a partir dos substratos **1**, **9** e **10**, respectivamente, usando cloridrato de hidroxilamina.

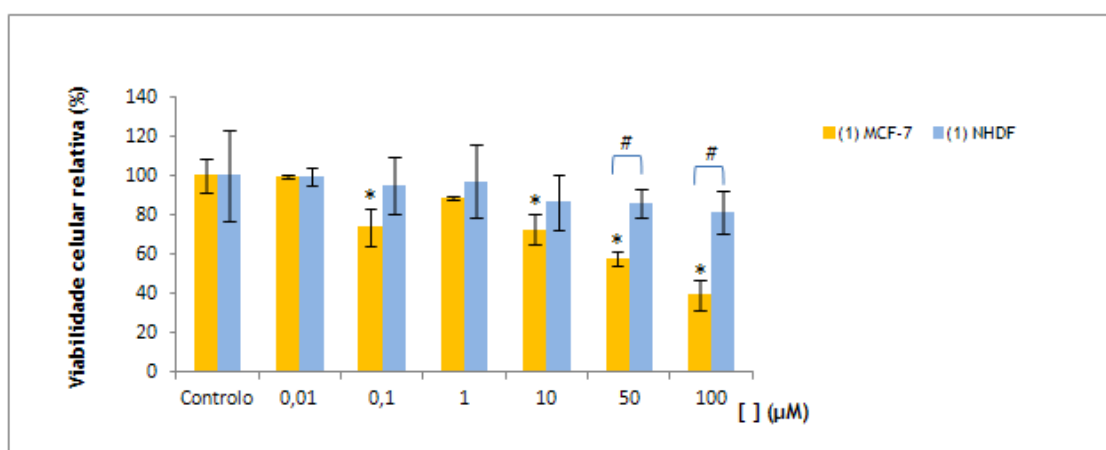
As estratégias de síntese escolhidas inicialmente foram parcialmente bem sucedidas, permitindo a preparação de uma série de 11 compostos esteróides de núcleo pregnano, funcionalizados em C-3, C-16, C-17 e C-20, nomeadamente no anel D do núcleo esteróide. As estruturas dos compostos sintetizados foram elucidadas por recurso a várias técnicas entre as quais se destacam o IV, <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN.

## 5.3 Avaliação biológica

### 5.3.1 Células NHDF e MCF-7

A avaliação biológica dos compostos pregnano esteróides sintetizados foi efectuada em células de cancro da mama humanas (MCF-7) e em células normais de fibroblastos da derme humana (NHDF) de forma a poder-se concluir acerca da citotoxicidade relativa destes compostos. Neste sentido, incubaram-se os diferentes tipos de células com estes compostos, em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , durante 48 h, após o qual, pelo ensaio MTT, se quantificou a absorvância de formazano a 570 nm.

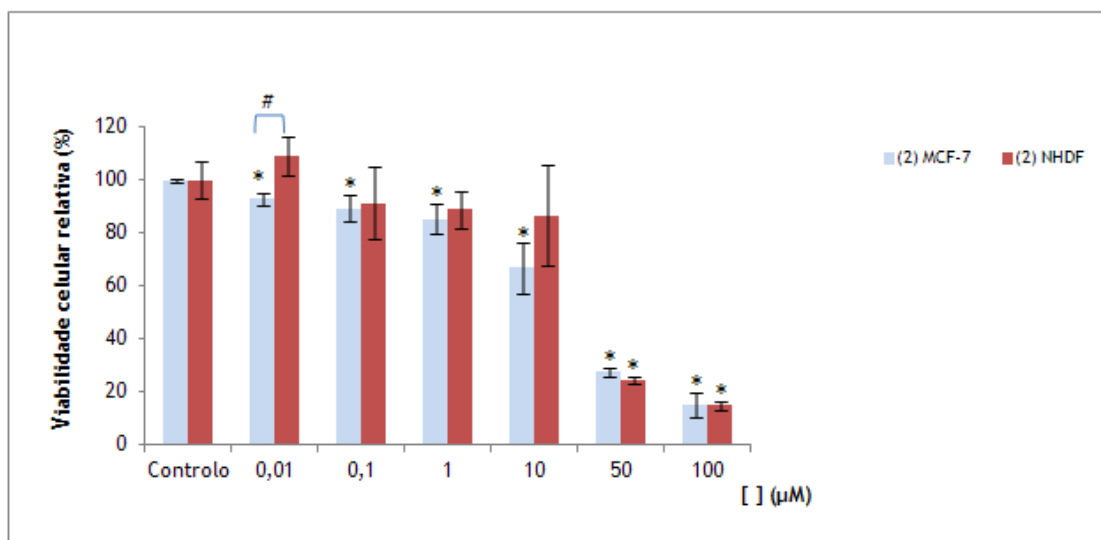
Tendo em conta a visualização do gráfico 1, verificamos que o composto 1 é mais tóxico nas células MCF-7 relativamente às NHDF, principalmente nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . Este facto também é comprovado pelos respectivos valores de IC<sub>50</sub> calculados para estas células, em que se obteve um valor substancialmente mais baixo nas células MCF-7. (tabela 2).



**Gráfico 1.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 1 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste t-student).

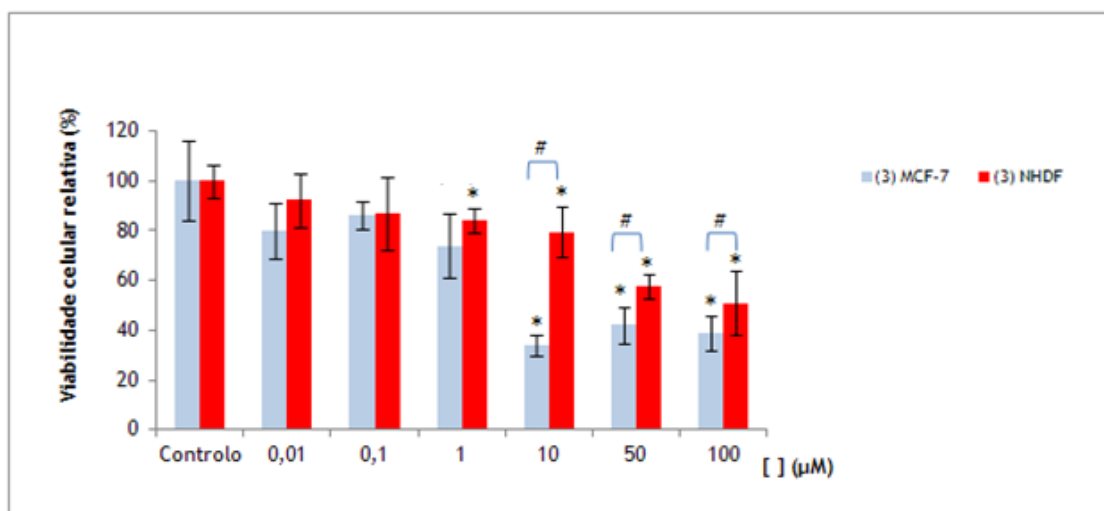
No mesmo contexto, verificou-se que o composto 2 não apresenta uma actividade significativa nas células MCF-7 comparando com as normais (gráfico 2). Todavia, o valor de IC<sub>50</sub> calculado deste composto nas células MCF-7 foi inferior ao obtido para as NHDF, o que denota uma importante citotoxicidade do esteróide 2 nestas células cancerígenas.



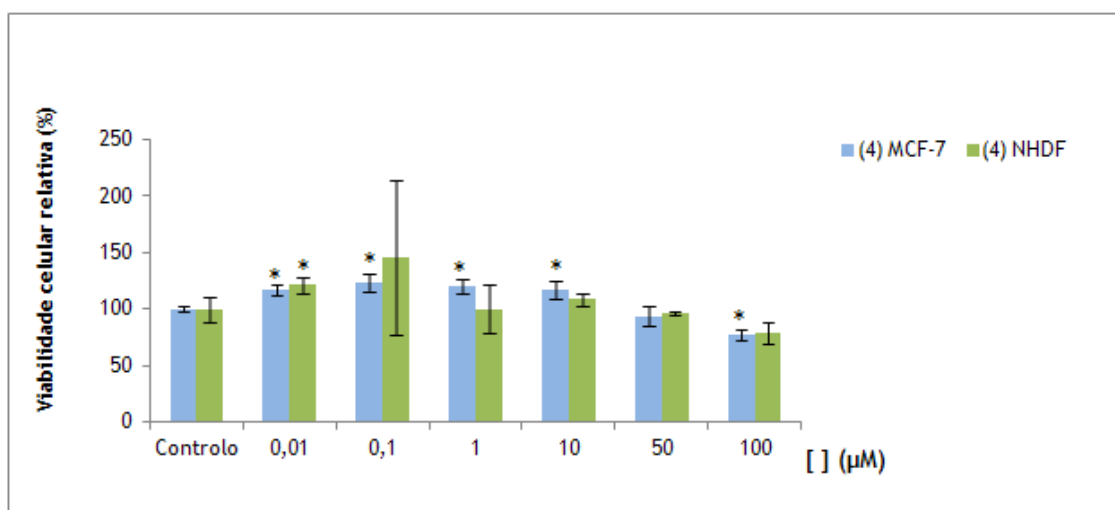


**Gráfico 2.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 2 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).

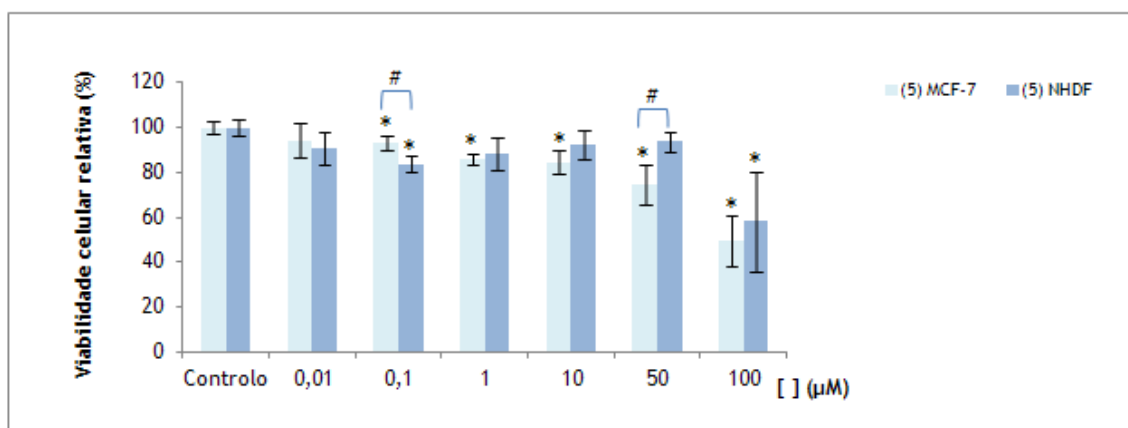
Relativamente ao composto 3 foi mais tóxico para as células MCF-7 (gráfico 3), principalmente nas concentrações de 1-100 µM. O composto 4 não se mostrou tóxico nas células MCF-7 (gráfico 4), ao contrário do composto 5, que mostrou uma citotoxicidade superior nas células MCF-7 relativamente às células NHDF, sendo mais tóxico para as células cancerígenas a 50 µM (gráfico 5). Em relação ao composto 6, verificou-se que também apresenta uma citotoxicidade superior para as células NHDF (gráfico 6), o que foi comprovado pelos valores de  $IC_{50}$  calculado deste composto nestas células (Tabela 2). Pode afirmar-se que este composto promoveu um decréscimo da proliferação celular das células MCF-7 nas concentrações de 0,1-1 µM e 50-100 µM.



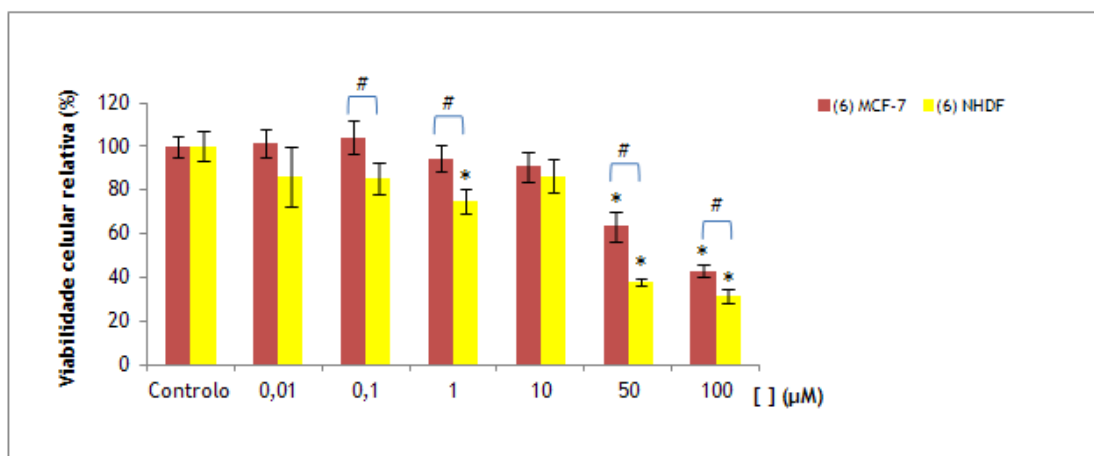
**Gráfico 3.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 3 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).



**Gráfico 4.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 4 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).



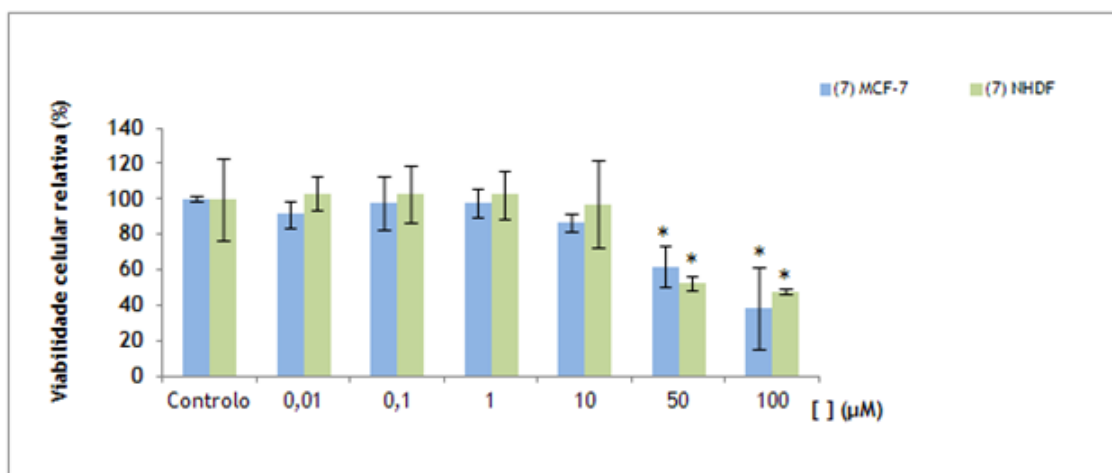
**Gráfico 5.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 5 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).



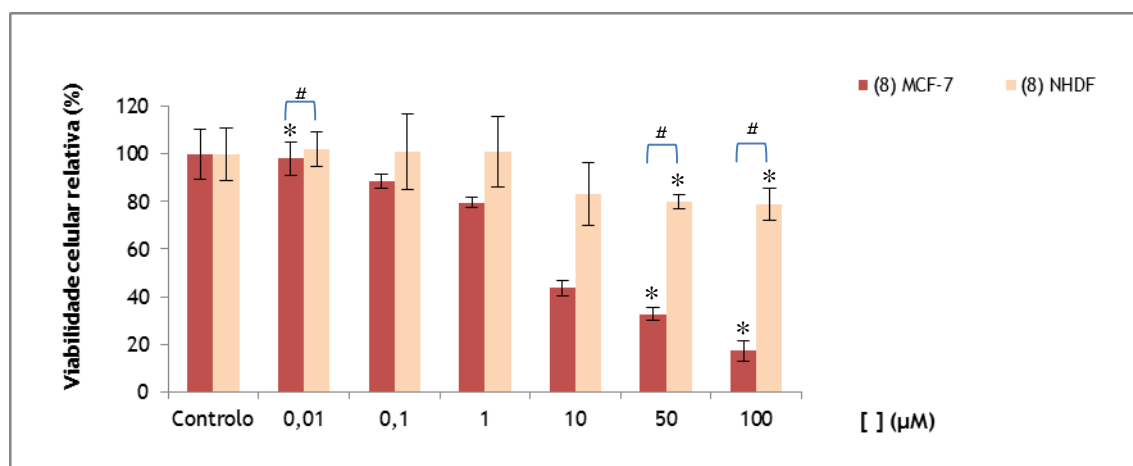
**Gráfico 6.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 6 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).

Como se pode visualizar no gráfico 7, o composto 7 também não apresentou citotoxicidade sobre as células MCF-7, o que está em concordância com o valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido para este esteróide nas células NHDF e MCF-7 ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$  em ambas as células).

Relativamente ao composto 8, verificou-se que este demonstrou uma elevada toxicidade nas células MCF-7 ( $\text{IC}_{50} 4,742 \mu\text{M}$ ) em comparação às células NHDF ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ). Nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , o esteróide 8 promoveu uma elevada inibição da proliferação das células de cancro da mama (gráfico 8).

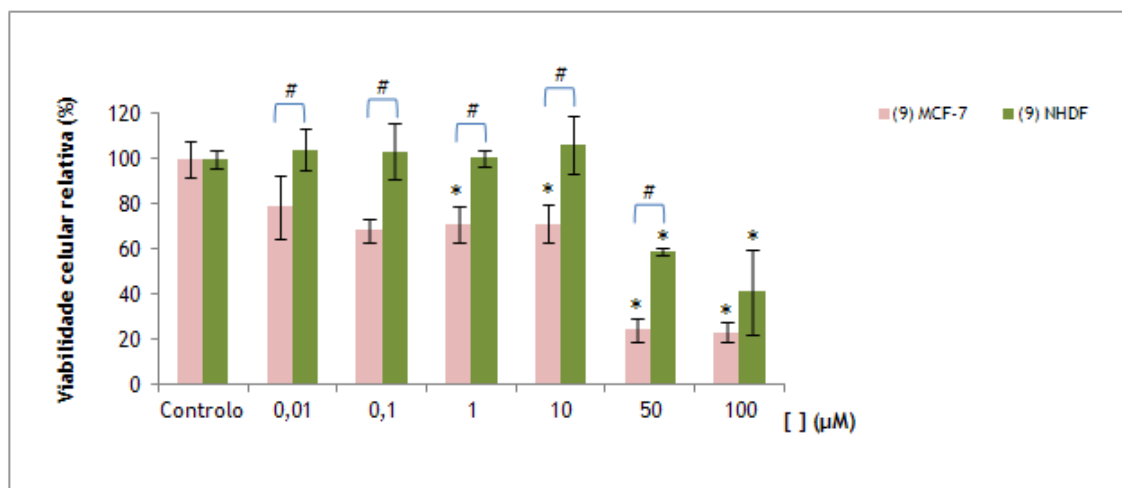


**Gráfico 7.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide **7** em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).

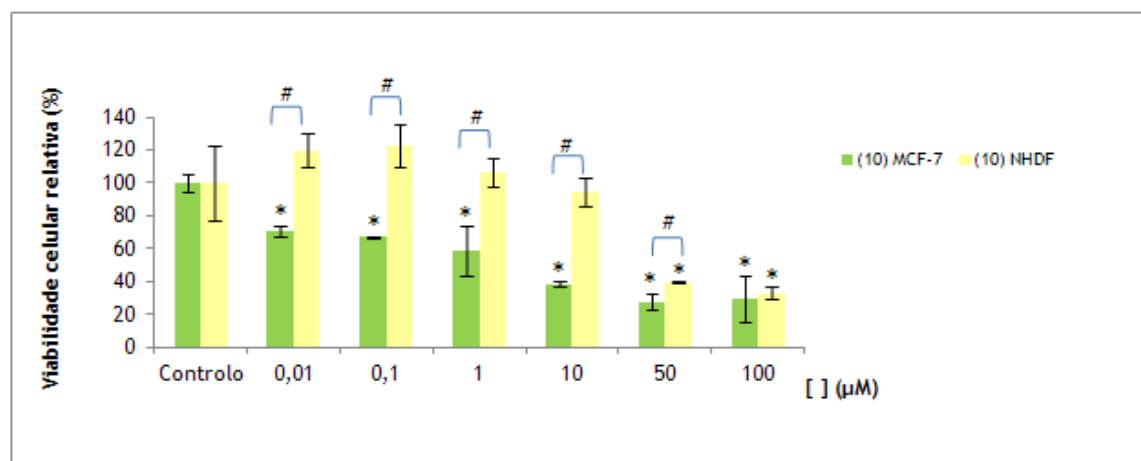


**Gráfico 8.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide **8** em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).

Os compostos **9** e **10** também mostraram elevadas citotoxicidades nas células MCF-7, sendo menos tóxicas nas células NHDF. Com exceção da concentração de 100  $\mu\text{M}$ , em todas as concentrações avaliadas o composto **9** e **10** inibiram a proliferação das células MCF-7 de forma constante (gráfico 9 e 10).



**Gráfico 9.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide **9** em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).

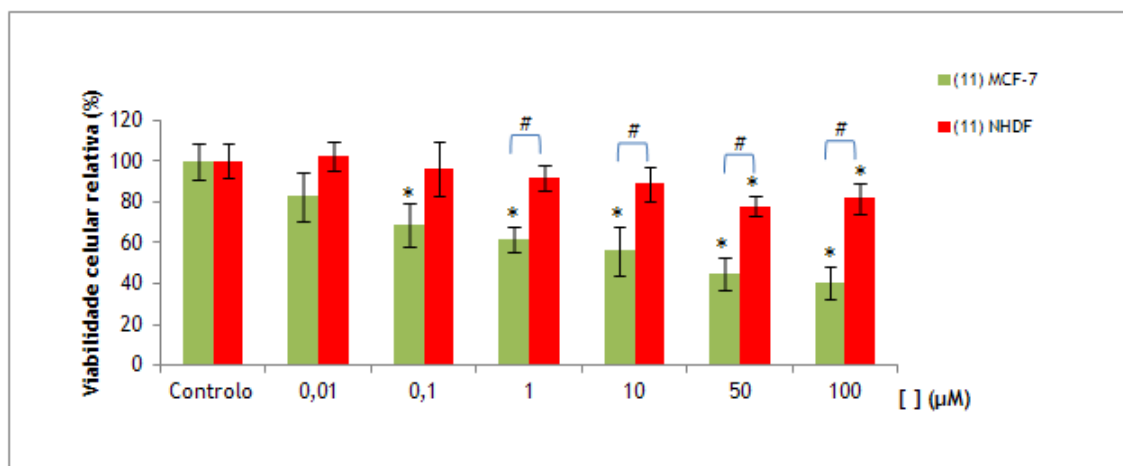


**Gráfico 10.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide **10** em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).

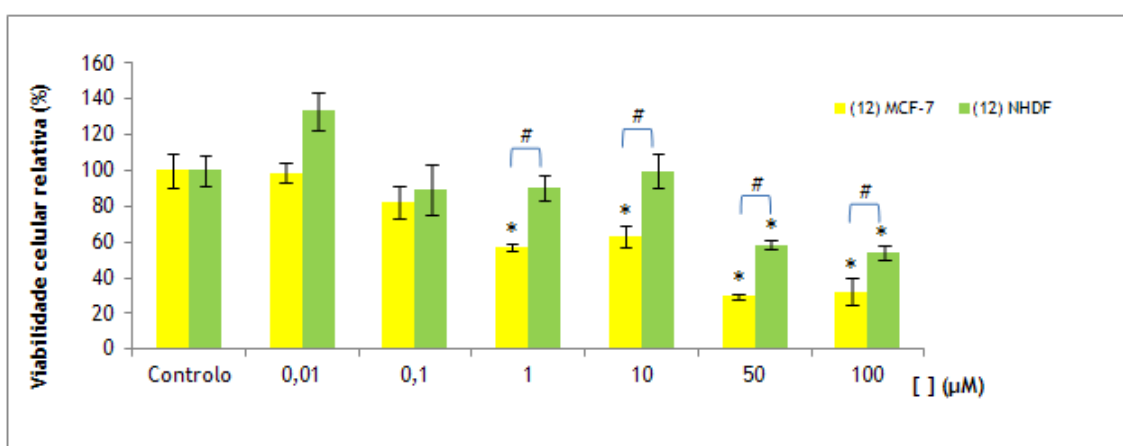
O composto **11** apresentou uma toxicidade superior nas células MCF-7, podendo afirmar-se, nestas condições experimentais, que inibiu a proliferação celular das células MCF-

7 na gama de concentrações 1-100  $\mu\text{M}$  (gráfico 11). Este facto também se observou com o composto 12, em que teve um comportamento semelhante à oxima 11, em que foi mais tóxico para as MCF-7 relativamente às NHDF, tendo uma acção inibitória significativa nas células de cancro de mama nas concentrações de 1-100  $\mu\text{M}$  (gráfico 12).

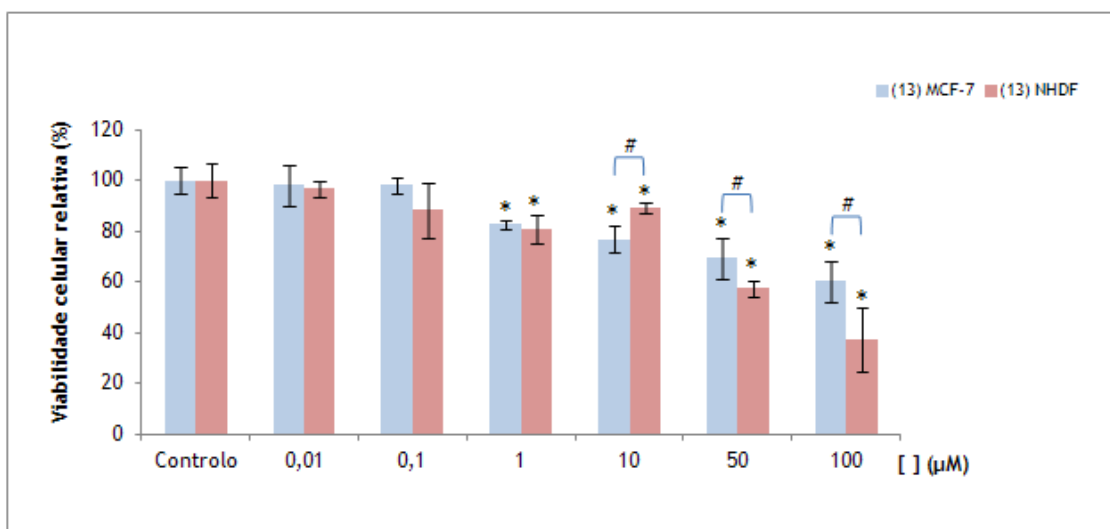
O composto 13, aparentemente, não se revelou tóxico para as células MCF-7. Nas concentrações mais elevadas (50 e 100  $\mu\text{M}$ ) este composto é mais tóxico para as células normais do que para as MCF-7.



**Gráfico 11.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 11 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste  $t$ -student).



**Gráfico 12.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 12 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste  $t$ -student).



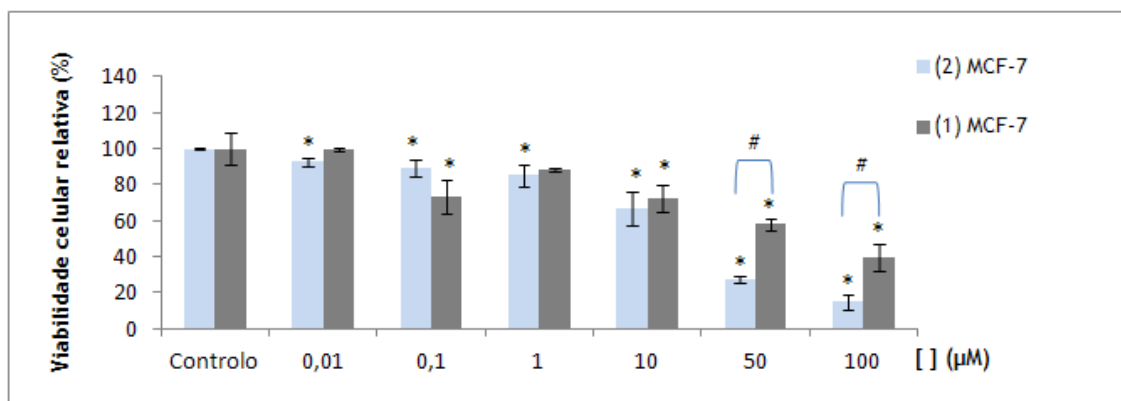
**Gráfico 13.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, quando incubadas com o esteróide 13 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student).

De acordo com as citotoxicidades mostradas pelos compostos compostos pregnano esteróides sintetizados nas células de cancro da mama humanas (MCF-7) e em células normais de fibroblastos da derme humana (NHDF), fizeram-se comparações entre os compostos nas células MCF-7 de forma poder-se concluir acerca da citotoxicidade relativa destes compostos nas células de cancro da mama.

Nestas condições experimentais, verificou-se que o composto 2 é mais tóxico para as células MCF-7 ( $IC_{50}$  30,31 µM) e NHDF ( $IC_{50}$  49,99 µM) em comparação com o composto 1. Contudo, ambos os compostos apresentam uma citotoxicidade superior nas células cancerígenas relativamente às células normais.

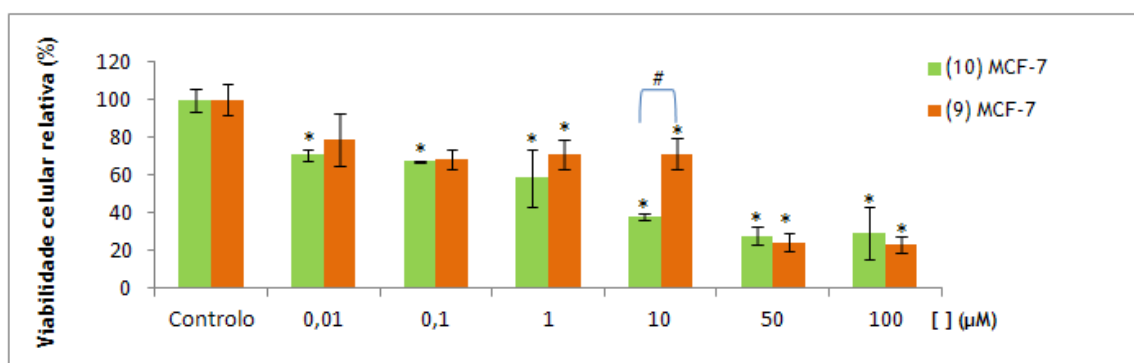
Como se pode visualizar no gráfico 14, o composto 2, nas concentrações de 50 e 100 µM, revelou-se mais tóxico para nas células MCF-7.

### 5.3.2 Comparações das citotoxicidades dos compostos pregnanos avaliados nas células MCF-7



**Gráfico 14.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, quando incubadas com os pregnanos 1 e 2 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste *t*-student ).

De seguida, avaliou-se as actividades biológicas dos compostos 9 e 10. Pela visualização do gráfico 15, verifica-se que o composto 10, relativamente ao composto 9, aparentemente, é mais tóxico para as MCF-7. Contudo, ambos os compostos apresentam uma citotoxicidade maior nas células MCF-7 do que nas NHDF (tabela 2), o que realça a actividade citotóxica destes esteróides. De acordo os resultados obtidos com o MTT, verificou-se que o composto hidroxilado 10 ( $IC_{50}$  3,141 µM) apresenta maior inibição da proliferação celular das MCF-7 relativamente ao composto 9 ( $IC_{50}$  53,88 µM). Contudo, pode afirmar-se que, a 10 µM, o composto 9 promove um decréscimo acentuado da proliferação celular das células MCF-7.

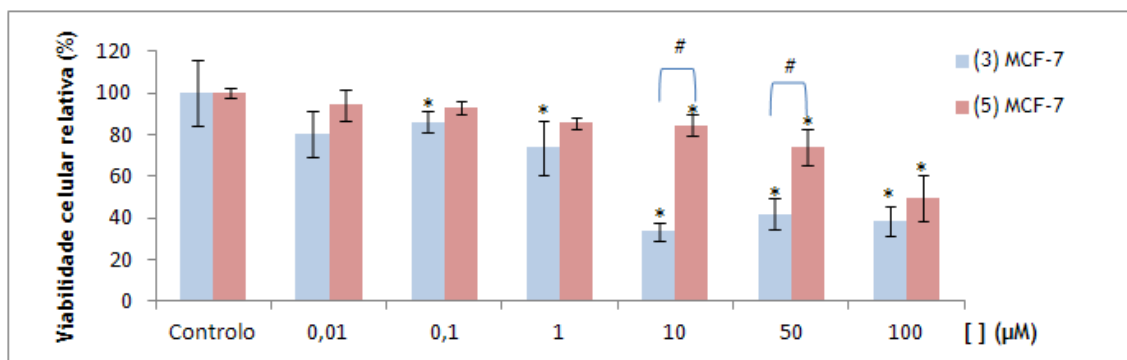


**Gráfico 15.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 9 e 10 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student ).



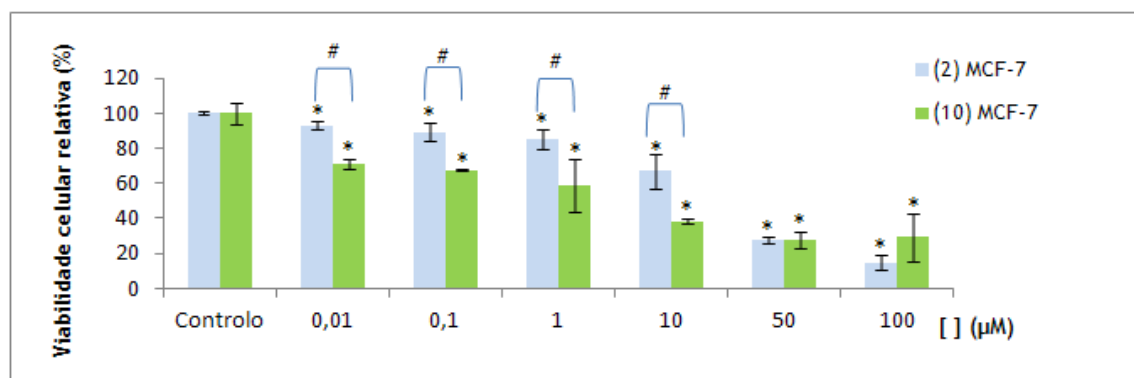
Tendo em conta a os pregnanos **3** e **5**, verifica-se que apresentam alguma capacidade de inibição da proliferação celular da linha celular MCF-7. Ambos denotam uma superior citotoxicidade nas células cancerígenas relativamente às células normais (tabela 2).

Como mostra o gráfico 16, verifica-se que o composto hidroxilado **3** denota uma maior citotoxicidade sobre as MCF-7. A 10 e 50  $\mu\text{M}$ , este composto promove um decréscimo acentuado da proliferação celular das MCF-7.



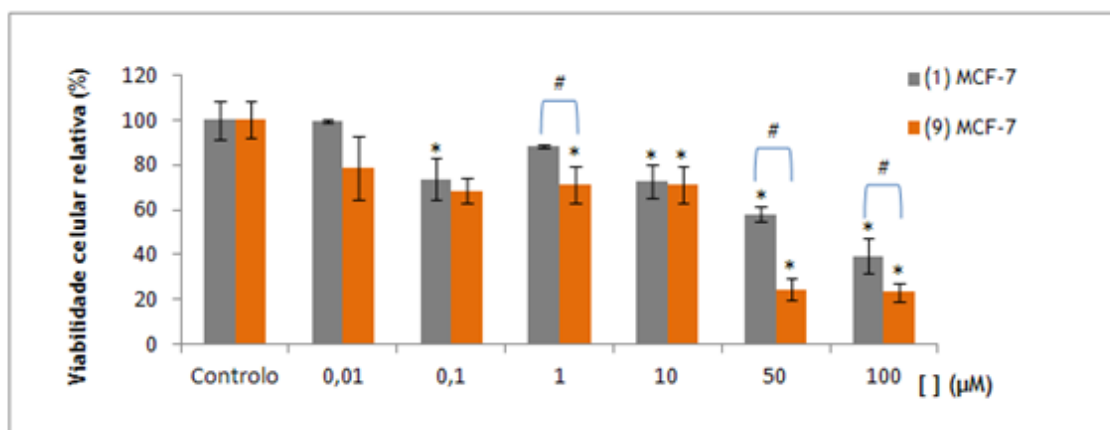
**Gráfico 16.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano **3** e **5** em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student ).

Relativamente aos compostos **2** e **10**, verifica-se que o pregnano **10** que não apresenta a olefina na posição 16,17, na gama de concentrações 0,01-10  $\mu\text{M}$ , denota uma relevante citotoxicidade, verificando-se um maior decréscimo da proliferação celular nas MCF-7 na presença deste composto (gráfico 17). De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que o composto **10** ( $\text{IC}_{50}$  3,141  $\mu\text{M}$ ) exerce uma maior citotoxicidade nas MCF-7 do que o composto **2** ( $\text{IC}_{50}$  30,01  $\mu\text{M}$ ).



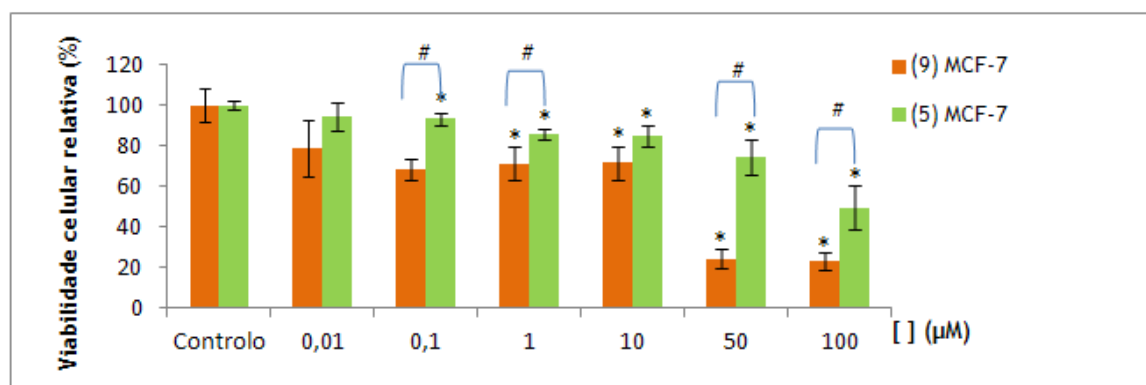
**Gráfico 17.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano **2** e **10** em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student ).

Com a visualização do gráfico 18, verificou-se uma diminuição da proliferação celular da MCF-7 quando em contacto com o composto 9, principalmente nas concentrações de 1, 50 e 100  $\mu\text{M}$ . De acordo com os resultados obtidos por MTT, comprova-se a superior citotoxicidade do composto 9 ( $\text{IC}_{50}$  53,88  $\mu\text{M}$ ) para as MCF-7, comparativamente ao composto 1 ( $\text{IC}_{50}$  70,58  $\mu\text{M}$ ).



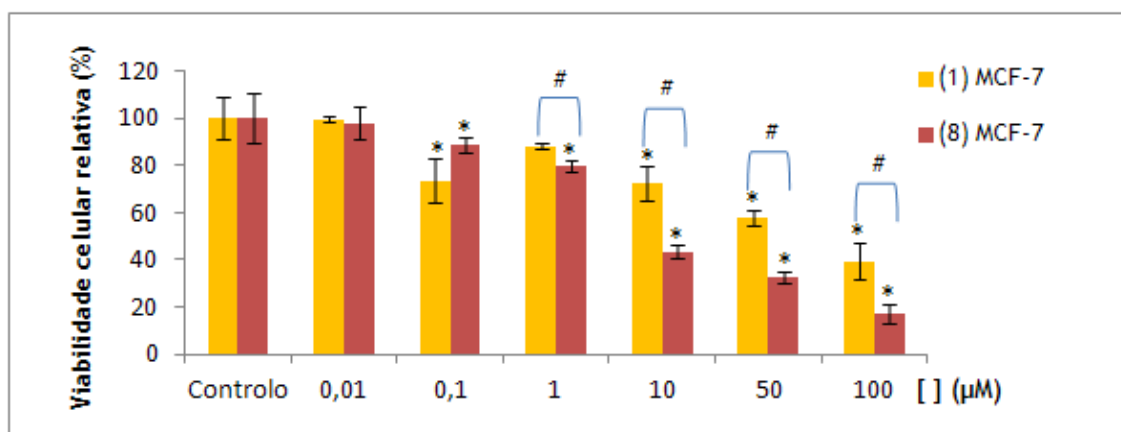
**Gráfico 18.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 1 e 10 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student).

Relativamente aos compostos mostrados no gráfico 19, foram menos tóxicos nas linhagens celulares normais relativamente à linha celular cancerígena da mama (tabela 2). Verifica-se que em todas as concentrações utilizadas, nestas condições experimentais, o pregnano 9 é muito mais tóxico para as MCF-7 do que o composto 5 (gráfico 19).



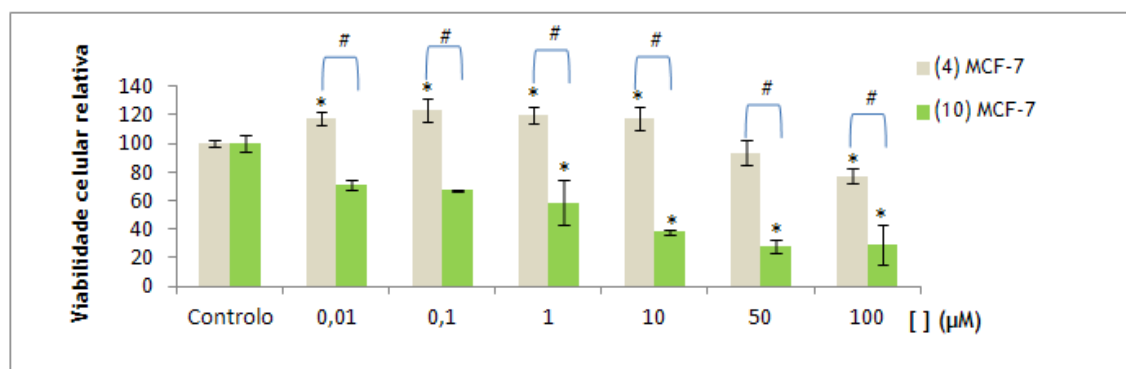
**Gráfico 19.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 5 e 9 em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student).

Nota-se, através da visualização do gráfico 20, que a oxima **8** denota uma superior citotoxicidade nas MCF-7 em relação ao composto **1**. Este facto é comprovado pelos respectivos obtidos no ensaio de MTT, em que o composto **8** ( $IC_{50}$  4,742  $\mu M$ ) é mais tóxico para as linhas celulares cancerígenas MCF-7 comparativamente ao composto **1** ( $IC_{50}$  70,58  $\mu M$ ). A diferença significativa entre as actividades distintas destes dois compostos está, principalmente, na gama de concentrações entre 1 a 100  $\mu M$ .

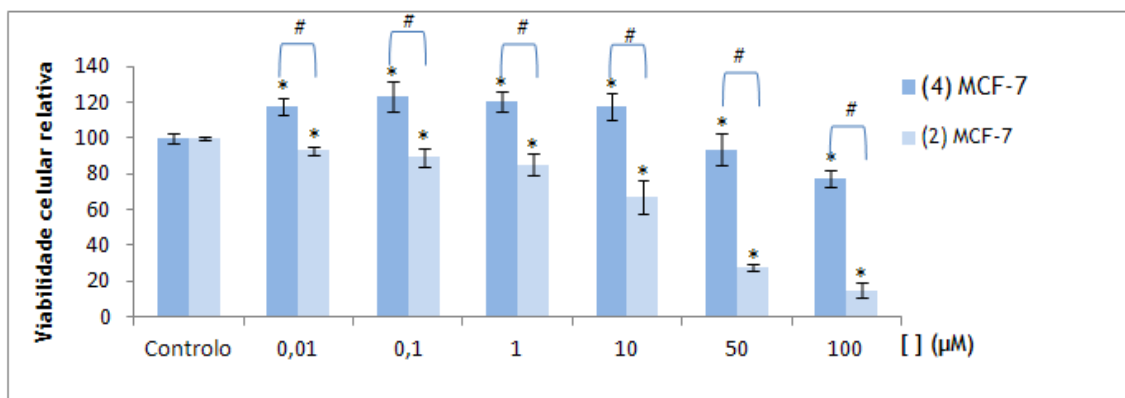


**Gráfico 20.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano **1** e **8** em concentrações entre 0,01  $\mu M$  e 100  $\mu M$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student).

De seguida, avaliou-se as actividades biológicas do dihidroxilado **4**. É importante salientar que este composto parece ter estimulado o vrescimento das células MCF-7 nas cocentrações mais baixas (gráficos 21 e 22).



**Gráfico 21.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano **4** e **10** em concentrações entre 0,01  $\mu M$  e 100  $\mu M$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student).



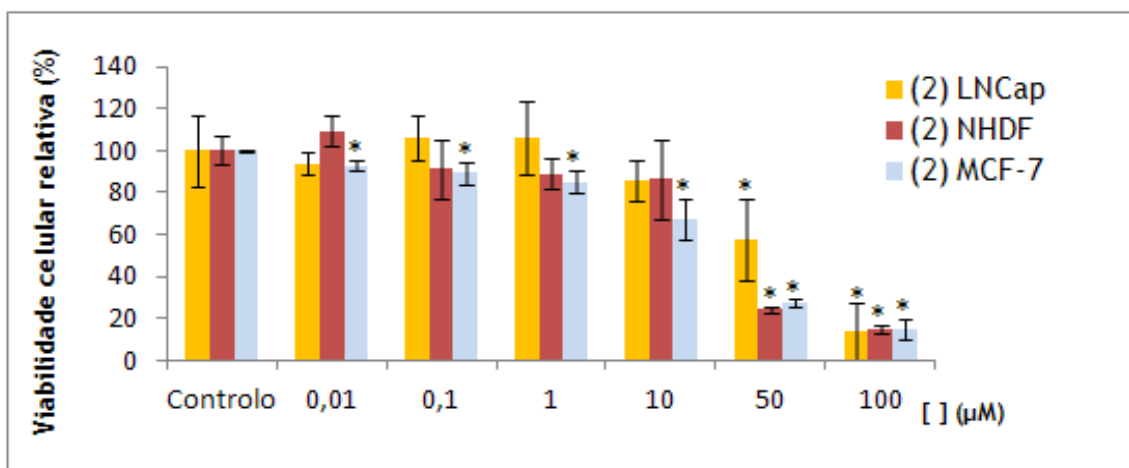
**Gráfico 22.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7 e NHDF, incubadas com os pregnano 2 e 4 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo e #  $p < 0,05$  versus concentrações (teste T student).

### 5.3.3 Comparações das citotoxicidades dos compostos pregnano avaliados nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

De acordo com os resultados verificados para as células MCF-7 e NHDF, verificou-se que, tendencialmente os derivados 3 $\beta$ -hidroxilados se revelaram mais tóxicos que os correspondentes 3 $\beta$ -acetilados. Este facto faz sentido, na medida em que os esteróides naturais análogos existentes no organismo humano são 3 $\beta$ -hidroxilados. Adicionalmente, este facto também é confirmado na literatura em compostos similares.<sup>69</sup>

Por esta razão, decidimos avaliar nas células LNCaP apenas os 3 $\beta$ -hidroxiesteróides em estudo nesta dissertação. A toxicidade das oximas também não foi estudada nestas células uma vez que este assunto já tinha sido abordado por outros autores no mesmo tipo de células.<sup>19</sup>

Como se pode observar no gráfico 23, a 16-desidropregnenolona (2) apresenta uma citotoxicidade aproximada para todos os tipos células estudadas. Contudo, o IC<sub>50</sub> calculado foi inferior para as células MCF-7 do que para as NHDF.

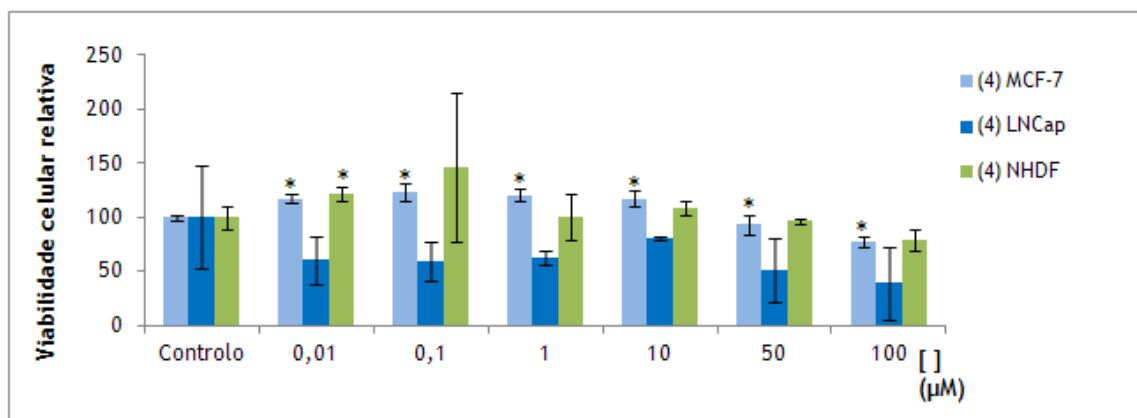


**Gráfico 23.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, quando incubadas com o esteróide 2 em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \* p<0,05 *versus* respectivo controlo ( teste *t*-student ).

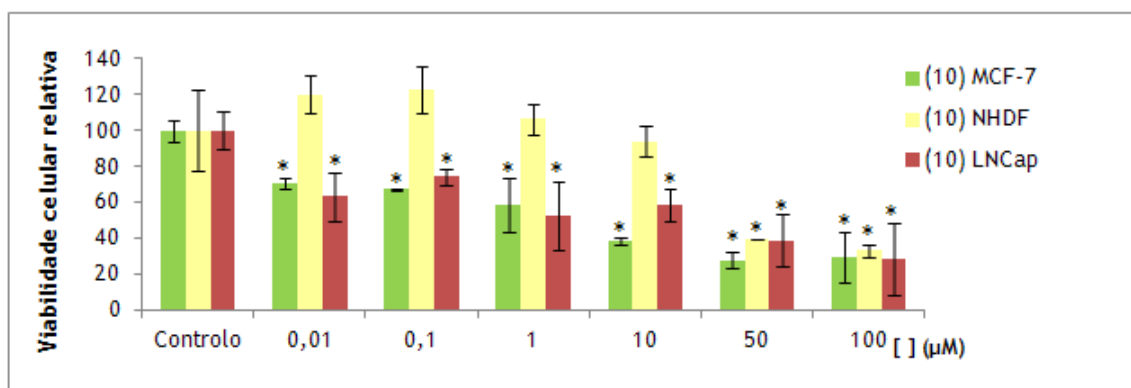
Relativamente ao composto 4, verificou-se que apresenta uma citotoxicidade semelhante nas células NHDF e MCF-7. Contudo, parece apresentar uma maior toxicidade para as células LNCaP, relativamente às NHDF e MCF-7 (gráfico 24).

Em relação à pregnenolona (10), verifica-se que é mais tóxica para as células cancerígenas comparativamente com as células normais. A pregnenolona exhibe uma significativa inibição do crescimento das células MCF-7 (IC<sub>50</sub> 3,141 μM), apresentando-se menos tóxica para as células normais (IC<sub>50</sub> 27,75 μM) (gráfico 24).

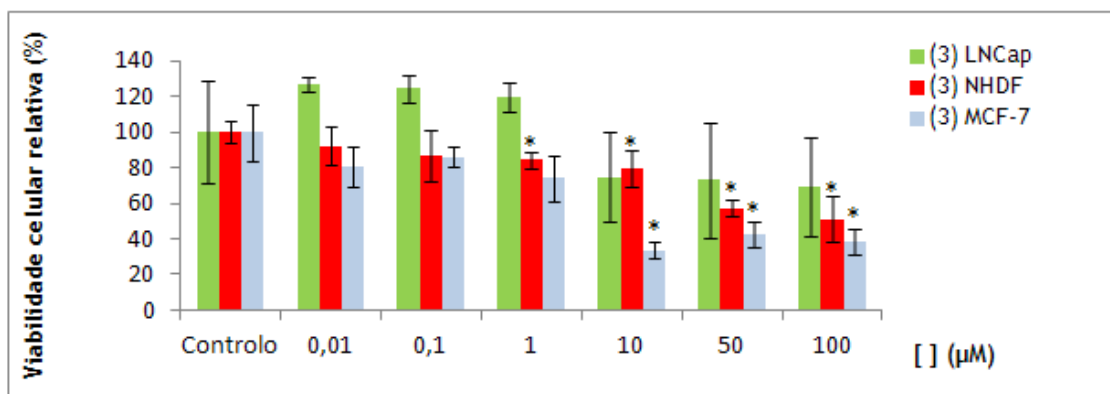
Quanto ao epóxido **3** verifica-se que é mais tóxico para as células MCF-7 e NHDF do que para as células LNCaP nas três concentrações mais baixas estudadas. Podendo, contudo, afirmar-se que é mais tóxico para as células de cancro da mama na gama de concentrações de 10-100  $\mu\text{M}$ . (gráfico 26).



**Gráfico 24.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, incubadas com o composto **4** em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo ( teste  $t$ -student ).



**Gráfico 25.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, incubadas com o pregnano **10** em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo ( teste  $T$  student ).



**Gráfico 26.** Viabilidade celular relativa das células MCF-7, LNCaP e NHDF, incubadas com o pregnano 3 em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM e durante 48h, determinada pelo ensaio MTT, através da quantificação da absorvância do formazano a 570 nm. Os dados estão expressos como percentagem da viabilidade celular em relação ao respectivo controlo; as barras representam a média e as linhas o desvio padrão da média associado. \*  $p < 0,05$  versus respectivo controlo ( teste T student ).

**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> dos compostos pregnano esteróides sobre as linhas de células MCF-7, LNCap e NHDF.

<b>Composto esteróide</b>	<b>MCF-7 IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>LNCap IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>NHDF IC<sub>50</sub> (μM)</b>
16-desidropregnenolona acetato	70,58		>100
16-desidropregnenolona	30,01	ND	49,99
16α,17α-epoxi-3β-hidroxi-5-en-20-ona	ND	>100	>100
3β,16α-dihidroxi-5-en-20-ona	>100	ND	>100
Acetato de 16α,17α-epoxi-20-oxopregn-5-en-3β-ilo	>100		>100
Acetato de 16α-hidroxi-20-oxopregn-5-en-3β-ilo	>100		84,51
Diacetato de 20-oxopregn-5-en-3β,16α-di-ilo	>100		>100
Acetato de 16α,17α-dihidroxi-20-oxopregn-5-en-3β-ilo	>100		>100
Pregnenonola acetato	53,88		>100
Pregnenolona	3,141	ND	27,75
Oxima da 16-desidropregnenolona acetato	4,742		>100
Oxima da pregnenolona acetato	ND		>100
Oxima da pregnenolona	ND		>100



## 5.4 Discussão

Os valores dos  $IC_{50}$  para cada composto em estudo e para cada tipo de célula estão sumarizados na Tabela 2. Nas células LNCap apenas foram avaliados os derivados  $3\beta$ -hidroxilados, não incluindo a oxima da pregnenolona, uma vez que esta já tinha sido estudada nestas células.<sup>19</sup>

Recentemente, têm sido descritos, num número considerável de publicações, os efeitos anti-proliferativos de um vasto número de compostos esteróides naturais e sintéticos.<sup>70</sup>

Esteróides provenientes de plantas, tais como glicósidos cardiotónicos, têm sido muito utilizados no tratamento de várias doenças, tais como a insuficiência cardíaca. Contudo, dados clínicos acerca dos seus efeitos anti-proliferativos encontram-se limitados. Neste contexto, têm-se desenvolvido esteróides com actividades biológicas importantes, como por exemplo, esteróides sintéticos como agentes anticancerígenos.<sup>71</sup>

Num estudo realizado por Minorics, et al. (2011)<sup>71</sup>, estudou-se a citotoxicidade de vários análogos da solanidina em linhas celulares cancerígenas.

Neste estudo concluiu-se que a presença ou ausência de um grupo hidroxilo no anel A influencia esta actividade biológica nestas moléculas. Verificou-se que, entre as moléculas testadas, o análogo mais potente contém um grupo  $3\beta$ -hidroxilo, enquanto que nas moléculas que contêm na posição 3 do núcleo esteróide um grupo  $3\beta$ -acetato exerceram uma inibição mais fraca da proliferação das células cancerígenas estudadas, nomeadamente as HL-60 (linha celular humana de leucemia).<sup>1</sup> Este facto, vai de encontro aos resultados obtidos no nosso trabalho com as células NHDF e MCF-7. De facto, tendo em conta a estrutura e os resultados obtidos na avaliação biológica dos compostos pregnano 1, 2, 3, 5, 9 e 10, nas células MCF-7 e NHDF, verifica-se que a presença de um grupo hidroxilo ao invés de um grupo acetato na posição  $3\beta$  do núcleo esteróide, leva a uma maior actividade citotóxica, sobretudo contra as células cancerígenas.<sup>71</sup>

Uma significativa actividade antitumoral foi demonstrada em vários compostos com um grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado na sua constituição.<sup>72</sup> Neste contexto, estudou-se a informação existente, no âmbito de esteróides, sobre actividade antiproliferativa em linhas celulares cancerígenas de carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados. Um exemplo, já referido anteriormente, a 2 $\beta$ -hidroxipregna-4,6,16-trien-3,20-diona, exhibe uma inibição significativa no crescimento de células cancerígenas.<sup>73</sup> Outro exemplo são os derivados  $\Delta^5$ -7-cetonas, que também têm sido associados a citotoxicidade.<sup>33</sup> Estes resultados, levaram-nos também à análise do efeito do grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado  $\Delta^{16}$ -20-cetona em comparação com os derivados correspondentes com a cetona saturada (Ex: pregnenolona) na sua constituição, e avaliar as respectivas actividades anti-tumorais destes tipo de compostos. Nas condições experimentais do estudo por nós realizado verificámos que, não só a enona não incrementava

a actividade antiproliferativa, como os derivados enona se revelaram menos tóxicos que os correspondentes derivados sem a insaturação.

Uma série de epóxidos da série pregnano têm sido sintetizados e avaliados em linhas celulares cancerígenas, verificando-se que são um grupo funcional com potencial antitumoral<sup>19</sup>. Os nossos resultados mostraram-nos que a introdução do 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epóxido não aumentou de forma relevante a citotoxicidade em comparação com a correspondente cetona  $\alpha$ , $\beta$ -insaturada e mesmo com a pregnenolona.

Os estudos efectuados por Liming bai, et al (2007)<sup>47</sup>, que efectuaram a extracção, caracterização e avaliação biológica de um 16 $\beta$ ,17 $\beta$ -epóxido (16 $\beta$ ,17 $\beta$ -epoxi-12 $\beta$ -hidroxipregna-4,6-dien-3,20-diona) em células WI-38 (fibroblastos humanos não-cancerígenos), VA-13 (fibroblastos cancerígenos) e HepG2 (células tumorais hepáticas) mostraram que nestas células este composto não apresentou actividades citotóxicas elevadas, porém, apresentam significativa actividades na reversão do mecanismo *multidrug resistance* (MDR) em células tumorais. Porém, como já referido, neste estudo, o análogo  $\Delta^{16}$ -20-cetona evidenciou ter um potencial elevado para inibir o crescimento celular das células VA-13 e HepG2.

Sujeong Kim e Eunsook Ma (2009)<sup>19</sup> sintetizaram uma série de derivados pregnano, incluindo 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxiesteróides, cuja actividade antiproliferativa foi avaliada em células cancerígenas da próstata: LNCaP (androgénio-dependentes) e PC-3 (androgénio-independente). De todos os compostos testados, o 1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -epóxido apresentou uma elevada citotoxicidade sobre ambas os tipos de células.

No nosso trabalho, sintetizaram-se dois 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epóxidos que foram testados nas células MCF-7 e NHDF. Através da análise dos resultados obtidos, verificou-se que o epóxido 3 (não-acetilado) foi mais tóxico para as células MCF-7 e NHDF do que o epóxido 5 (3 $\beta$ -acetilado). Nas células LNCaP, apenas foi avaliado o epóxido não-acetilado, pelas razões já expostas. Dos resultados por nós obtidos, parece existir uma selectividade na acção deste pregnano para as células cancerígenas MCF-7, uma vez que, para além ser mais tóxico para as células cancerígenas da mama numa gama de concentrações de 10-100  $\mu$ M comparativamente às NHDF, não induziu a inibição tão acentuada na proliferação das células LNCaP, sendo até mais tóxico para as células normais em comparação com estas.

A introdução da função oxima no núcleo esteróide tem sido uma forma de desenvolver potenciais agentes terapêuticos, incluindo compostos com acção antiproliferativa.<sup>75</sup>

Neste sentido, também decidimos avaliar a presença desta funcionalidade nos nossos compostos. Os resultados por nós obtidos nas células MCF-7 e NHDF mostraram que nos derivados 16,17-saturados a introdução da oxima revelou ser detrimental para a acção antiproliferativa, uma vez que os correspondentes derivados cetona se mostraram geralmente mais citotóxicos. O estudo de Kim e Ma, com células LNCaP e PC-3 evidenciou também que a oxima da pregnenolona não teve acção antiproliferativa significativa contra estas células.<sup>19</sup> Contudo, nas nossas condições experimentais, para a oxima do acetato de 16-desidropregnenolona, obteve-se um resultado interessante, com elevada potência

antiproliferativa nas células MCF-7 ( $IC_{50} = 4,742 \mu M$ ) e elevada selectividade para estas células cancerígenas em relação às células não-cancerígenas (NHDF) ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ).

Por fim, também se avaliou a presença de um grupo  $16\alpha$ -hidroxilo nos nossos compostos. Os resultados por nós obtidos nas células MCF-7 e NHDF mostraram que a introdução de um grupo hidroxilo na posição  $16\alpha$  do núcleo esteróide não levou a uma acção anti-proliferativa nas células MCF-7. Contudo, a introdução deste grupo parece ter revelado uma actividade selectiva sobre as células LNCaP, uma vez que apresenta uma maior toxicidade para estas células relativamente às NHDF e MCF-7.

O composto di-hidroxilado **4** a baixas concentrações leva a um aumento relativo dos valores de absorvância a 570 nm relativamente ao controlo, indicando que tem um efeito estimulante na proliferação das células LNCaP.

P. Bunyathaworn (2010)<sup>70</sup> avaliaram derivados esteróides em células de cancro da mama (MCF-7) e cancro do pulmão (NCI), e compararam a citotoxicidade de compostos aromáticos no anel A com diferentes grupos funcionais e funcionalizados em C-16. Neste estudo verificou-se que, aparentemente, a ausência do grupo hidroxilo no C-16 levou a um decréscimo, da citotoxicidade dos compostos avaliados nas células cancerígenas. Contudo, também se verificou que a introdução do grupo  $16\alpha$ -OH, mostrou elevadas citotoxicidade sobre as células MCF-7 e NCI.<sup>70</sup>

O  $16\alpha,17\alpha$ -diol teve fraca acção antiproliferativa nas células anticancerígenas e não afectou as células NHDF, mas não estimulou o seu crescimento celular.



## 6. Conclusão

O cancro é uma patologia com elevada morbilidade e mortalidade e enorme impacto sócio-económico nos dias de hoje. O objectivo geral do presente trabalho foi a descoberta e desenvolvimento de compostos químicos com potencial acção anticancerígena. Neste sentido, foram sintetizados, purificados e parcialmente caracterizados, por IV e RMN, vários esteróides pregnanos funcionalizados no anel D, principalmente hidroxilados, com e sem grupo 3 $\beta$ -acetato e 20-oximas. As vias sintéticas seguidas permitiram a obtenção de rendimentos moderados a elevados dos pregnanos referidos.

A acção antiproliferativa dos esteróides pregnanos preparados foi avaliada em células cancerígenas (MCF-7 e LNCaP) e normais (NHDF) e, quando possível, foi determinado o IC<sub>50</sub>. Assim, tendo em conta a análise da relação estrutura-actividade citotóxica, neste estudo, verificou-se que os derivados 3 $\beta$ -acetilados revelaram ser tendencialmente menos anti-proliferativos que os correspondentes derivados hidroxilados (células MCF-7 e NHDF); a ausência da dupla ligação  $\Delta$ 16 revelou ser benéfica para a acção antiproliferativa nestas células, em comparação com a sua presença; a presença do 16 $\alpha$ -OH originou um efeito proliferativo nas células MCF-7, não levou a afeitos visíveis nas células NHDF e parece ter efeito anti-proliferativo nas LNCaP; o 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol teve fraca acção antiproliferativa nas células anticancerígenas e não afectou as células NHDF, mas não estimulou o seu crescimento celular. Por último, concluiu-se que a presença da 20-oxima favoreceu a actividade antiproliferativa selectiva para as células cancerígenas MCF-7 em comparação com o análogo 16-saturado.

Vários compostos revelaram citotoxicidade selectiva para células cancerígenas em relação às células normais, e são potencialmente exploráveis em estudos futuros para aprofundamento dos seus efeitos e continuação da avaliação do seu potencial interesse como compostos anticancerígenos.



## 7. Bibliografia

- [1] - Barros H., Lunet N. *Cancro Uma Perspectiva de Saúde Pública*, ArquiMed, 2006, ISSN 0871-3413.
- [2] - <http://www.ligacontracancro.pt/> acedido a 20 de maio de 2011.
- [3] - Mantovani A. *Cancer: Inflaming metastasis*. *Nature*, 2009, 457(7225): 36-37.
- [4] - Jemal, A., F. Bray, et al. *Global cancer statistics*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] - Gobec S.; Brozic P.; et al. *Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 15, 137, e referências aí citadas.
- [6] - Farin Kamangar F.; Dores G.; Anderson W. *Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World*, 2006, 2137-2150.
- [7] - Dey, S.; Soliman, A.S.; Merajver, S.D.; *Xenoestrogens may be the cause of high and increasing rates of hormone receptor positive breast cancer in the world*, *Medical Hypotheses*, 2009, 72(6), 652-6.
- [8] - Pisani P, Parkin D., et al. *Estimates of the worldwide mortality from twenty five majors cancers in 1990*. *International Journal of Cancer*, 1999, 83: 18-29.
- [9] - Pillai, K., Murray, et al. *Steroids. 2. Synthesis of C-18 functionalized steroids via the Smith-Hughes route*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1984, 27(9): 1131-1137.
- [10] - Goldhirsch, A.; Glick, J.H. *Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005*. *Annals of Oncology*, 2005, 10, 1569.
- [11] - Cepa, M.; Tavares, J.; et.al. *Structure-activity relationships of new A,D-ring modified steroids as aromatase inhibitors: design, synthesis, and biological activity evaluation*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005, 20, 6379.
- [12] - Poola, I. and Q. Yue. *Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) mRNA copy numbers in immunohistochemically ER $\alpha$ -positive-, and negative breast cancer tissues*, *BMC Cancer*, 2007, 7(1): 56.
- [13] - Huggins C.B., *The hormone-dependent cancers*, *The Ben May Laboratory for Cancer Research - The University of Chicago School of Medicine*, Chicago, Illinois, (1963).
- [14] - Krstić, N. M., M. S. Bjelaković, et al. *Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities*. *Steroids*, 2007, 72(5): 406-414.
- [15] - *Pharmacotherapy Handbook*. 7th Edition. Wells BG, DiPiro JP. 2008. New York. McGraw Hill Inc.
- [16] - Smith E. and M. Dowsett. *Aromatase Inhibitors in Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2003, 348(24): 2431-2442.
- [17] - ONDRE, et al. *Steroselective synthesis of some steroidal oxazolines, as novel potential inhibitors of 17 $\alpha$ -hydroxylase-C<sub>17,20</sub>-lyase*. *Steroids*, 2009, 74, 1025-1032.

- [18] - Moreira, V., Vasaitis T., et al. *Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors*. *Steroids*, **2007**, 72(14): 939-948.
- [19] - Kim, S.; E. Ma. *Synthesis of Pregnane Derivatives, Their Cytotoxicity on LNCap and PC-3 Cells, and Screening on 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitory Activity*. *Molecules*, **2009**, 14(11): 4655-4668.
- [20] - Ty B. Carroll, MD, David C. Aron, MD, MS, James W. Findling, MD and J. Blake Tyrrell, MD., "GREESNPAN: Basic & Clinical Endocrinology: Capitulo 9. Glucocorticoids and Adrenal Androgens", **2001**, Pag. 334-342.
- [21] - Poirier, D., *New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens*. *Drug Development Research*, **2007**, 69(6): 304-318.
- [22] - Lednicher, D., *Strategies for Organic Drug Synthesis and Design*; John Wiley & Sons, Inc.: New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto, **2009**. Capítulos 4 e 5, pp. 84-145.
- [23] Quintas A.; Freire A.;, et al. *BIOQUÍMICA Organização Molecular da Vida*, 2008, 459-464.
- [24] - Williams D.; Lemke T. L.; Foye's Principles of Medicinal Chemistry; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 5th Edition, **2002**, cap.29.
- [25] - Wynsberghe, D. V.; Noback, C. R.; Carola, R. *Human Anatomy & Physiology*, McGraw-Hill, Inc.: Boston-Burr Ridge-Dubuque-Madison-New York-SanFrancisco-St. Louis, **1995**.
- [26] - Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology*, WB Saunders Company: Philadelphia, **2000**.
- [27] - Moreira, V. M. A., *Novos esteróides inibidores da biossíntese de androgénios*, Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008, e referências aí citadas.
- [28] - Gomes RL; Meredith W. *Conjugated steroids: analytical approaches and applications*, *Anal Bioanal Chemistry* , **2009**, 393:453-458.
- [29] - Lednicher, D. *Strategies for Organic Drug Synthesis and Design*; John Wiley & Sons, Inc.: New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto, **1998**. Capítulos 4 e 5, pp. 84-145.
- [30] - Williams, D. A.; Lemke, T. L. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 5th Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo, **2002**. Capítulos 25, 28, 29 e 31.
- [31] - Schroepfer, G. J. *Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes*, *Physiological Reviews*, **2000**, 80, 361-554.
- [32] - Banday, A. H., S. A. Shameem, et al. *D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation*. *Steroids*, **2010**, 75(12): 801-804, e referências e aí citadas.
- [33] - Silvestre, S. *Novos processos de oxidação ambientalmente aceitáveis usando esteróides como substratos* , Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, **2007**, e referências aí citadas.



- [34] - Lednicer, D.; Mitscher, L. A. *The Organic Chemistry of Drug Synthesis*; John Wiley and Sons: New York-London-Sydney-Toronto, 1977. Vol. 1, capítulo 10, pp. 155-211;
- [35] - Boonananwong, S., "Part I: Synthesis of C-3, C-16 e C-20 polyoxygenated steroids isolated from marine organisms with anticancer activity Part II: 3-,4- and 5-component cascade reactions using palladium catalysts Part II: asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reaction and development of a new class of chiral phosphoramidite ligands for asymmetric catalysis", dissertação de doutoramento apresentada à Universidade Kasetsart, Tailândia, 2008.
- [36] - Goswami, A., R. Kotoky, et al. A One-Pot Efficient Process for 16-Dehydropregnenolone Acetate. *Organic Process Research & Development*, 2003, 7(3): 306-308, e referências aí citadas.
- [37] - Micovic I., Ivanovic, M.; et al. *Simplified Preparation of 16-Dehydropregnenolone Acetate*, *Synthesis Stuttgart*, 2003, 591-592.
- [38] - Marker, R., Wagner R., et al. *Steroidal Sapogenins1a*. *Journal of the American Chemical Society*, 1947, 69(9): 2167-2230.
- [39] - Fernandes, P., A. Cruz, et al. *Microbial conversion of steroid compounds: recent developments*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32(6): 688-705.
- [40] - Huggins C.B., *The hormone-dependent cancers*, The Ben May Laboratory for Cancer Research - The University of Chicago School of Medicine, Chicago, Illinois, (1963);
- [41] - *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 6<sup>th</sup> Ed., D.A. Williams; T.L. Lemke, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, Cap. 33.
- [42] - Goodwin B, Gauthier KC, Umetani M, Watson MA, Lochansky MI, Collins JL, Leitersdorf E, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, Repa JJ: *Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane  $\times$  receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(1):223-228.
- [43] - Verma, S., M. Tabb, et al. *Activation of the steroid and xenobiotic receptor, SXR, induces apoptosis in breast cancer cells*. *BMC Cancer*, 2009, 9(1): 3.
- [44] - <http://www.infarmed.pt/prontuario>, acedido às 18.00 h do dia 27 de Setembro de 2011.
- [45] - Jordan VC. *Tamoxifen for breast cancer prevention*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1995, 208(2):144-149.
- [46] - *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 6<sup>th</sup> Ed., D.A. Williams; T.L. Lemke, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, Cap. 45 e 46;
- [47] - Bai, L., L. Wang, et al. *Bioactive Pregnanes from Nerium oleander*. *Journal of Natural Products*, 2006, 70(1): 14-18.
- [48] - Ling, Y. Li, J., et al., *Synthesis and In Vitro Activity of some Epimeric 20 $\alpha$ -Hydroxy, 20-Oxime and Aziridine Pregnene Derivatives as Inhibitors of Human 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C17,20-Lyase and 5 $\alpha$ -Reductase*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1998, 6, 1683-1693

- [49] - Quang, T. , Ha T., et al. *Cytotoxic and PPARs transcriptional activities of sterols from the Vietnamese soft coral Lobophytum laevigatum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2011**, 21(10): 2845-2849.
- [50] - Iqbal, M., Yousuf, S., et al. *Pregnenolone Derivatives as Potential Anticancer Agents*, *Steroids*, **2011**, e referências aí citadas.
- [51] - Shan, L., Liu, H., et al. *Synthesis of 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -trihydroxy-pregn-21-benzylidene-5-en-20-one derivatives and their cytotoxic activities*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009** (23): 6637-6639.
- [52] - Lia, C., Qiu, W., et al., *Stereoselective synthesis of some methyl-substituted steroid hormones and their *in vitro* cytotoxic activity against human gastric cancer cell line MGC-803*, *Steroids*, **2010**, 75(12), 859-869.
- [53] - Shingate B, Hazra B., et al. *Stereoselective syntheses of 20-epi cholanolic acid derivatives from 16-dehydropregnenolone acetate*." *Tetrahedron*, **2007**, 63(25): 5622-5635.
- [54] - Shingate B., Hazra G., et al. *Stereoselective synthesis and antimicrobial activity of steroidal C-20 tertiary alcohols with thiazole/pyridine side chain*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46(9): 3681-3689.
- [55] - Julian, P., Meyer E., et al. *Sterols. XI. 17 $\alpha$ -Hydroxy-11-desoxycorticosterone (Reichstein's Substance S)*. *Journal of the American Chemical Society*, **1950**, 72(11): 5145-5147.
- [56] - Litvinovskaya, R. , Drach, S., et al. *Synthesis and Transformations of 20-Isoxazolylsteroids with Modified D Ring: I. Synthesis of 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxyderivatives*. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 37(6): 787-792.
- [57] - Salvador, J., Leitão A., et al. *Hydrazine hydrate induced reductive cleavage of [ $\alpha$ ],[ $\beta$ ]-epoxy ketones: an efficient procedure for the preparation of  $\beta$ -hydroxy ketones*. *Tetrahedron Letters*, **2005**, 46 (7): 1067-1070.
- [58] - Julian, P., Meyer E., et al. *Sterols. X. 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone*. *Journal of the American Chemical Society*, **1950**, 72(1): 367-370.
- [59] - Shull, B. K.; Koreeda M., *Reduction of 17 $\alpha$ -hydroxy-20-keto steroids: convenient synthesis of (E)-3 $\beta$ -hydroxy-5,17(20)-pregnadiene 3-pivaloate and (Z)-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -dihydroxy-5,17(20)-pregnadiene 3-pivaloate*. *The Journal of Organic Chemistry*, **1990**, 55(1): 99-105.
- [60] - Rosenkranz, G., O. Mancera, et al. *Steroids. LXXXI.1 Transformation of Sapogenins to Androgens and Estrogens. Beckmann Rearrangement of  $\Delta^{16-20}$ -Ketosteroids*. *The Journal of Organic Chemistry*, **1956**, 21(5): 520-522.
- [61] - Litvinovskaya, R., Drach S., et al. *Synthesis and Transformations of 20-Isoxazolyl Steroids with Modified Ring D: II. Synthesis of 16 $\alpha$ -Acetoxy Derivatives*. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 37(7): 952-956.

- [62] - Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65(1-2), 55-63.
- [63] - Solomons & Fyhle; "Organic chemistry", eight edition, LTC, volume 1, 2004.
- [64] - Carvalho, J., Silva M., et al. *Highly efficient epoxidation of unsaturated steroids using magnesium bis(monoperoxyphthalate) hexahydrate*, *Tetrahedron*, **2009**, 65(14): 2773-2781.
- [65] - Sakakura, A., K. Kawajiri, et al. *Widely Useful DMAP-Catalyzed Esterification under Auxiliary Base- and Solvent-Free Conditions*. *Journal of the American Chemical Society*, **2007** 129(47): 14775-14779.
- [66] - Grondal, C. 4-Dimethylamino-pyridine (DMAP). *Synlett*, **2003**(10): 1568,1569.
- [67] - Murugan, R. and E. F. V. Scriven. Applications of dialkylaminopyridine (DMAP) catalysts in organic synthesis. *Aldrichima Acta*, **2003**, 36(1): 21-27.
- [68] - Cooley, G., B. Ellis, et al. Hydroxylation of pregn-16-en-20-ones. Part I. Permanganate oxidation of pregn-16-en-20-ones." *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, **1955**, 4373-4377.
- [69] - Minorics, R., T. Szekeres, et al. *Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro*. *Steroids*, **2011**, 76(1-2): 156-162.
- [70] - Bunyathaworn, P., S. Boonananwong, et al. Further study on synthesis and evaluation of 3,16,20-polyoxygenated steroids of marine origin and their analogs as potent cytotoxic agents. *Steroids*, **2010**, 75(6): 432-444.
- [71] - Minorics, R., T. Szekeres, et al. *Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro*. *Steroids*, **2011**, 76(1-2): 156-162.
- [72] - Nakayachi, T., Yasumoto E., et al. *Structure-Activity Relationships of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Unsaturated Ketones as Assessed by their Cytotoxicity against Oral Tumor Cells*." *Anticancer research*, **2004**, 24(2B): 737-742.
- [73]- Piir, E.A., Morozevich, G.E., et al.,  $\Delta^5$ -7-Ketosterols with Modified Side Chain: The Synthesis and the Effects on Viability and Cholesterol Biosynthesis in Hep G2 Cells, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **2006**, 32(5), 497-503.
- [74] - Sun L., Fu W., et al. *Cytotoxic constituents from Solanum lyratum*, *archives of pharmacal research*, **2006**, 29(2):135-9.
- [75] - Li, J., Li Y., et al. *Synthesis and Evaluation of Pregnane Derivatives as Inhibitors of Human Testicular 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C17,20-Lyase*. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1996**, 39(21): 4335-4339.